

# **Die Rolle von MGMT in der Häm-Eisen-vermittelten kolorektalen Kanzerogenese**

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur  
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte

## **Dissertation**

D386

vorgelegt von

**Nina Susanne Seiwert**

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Jörg Fahrer

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 06.02.2020

Kaiserslautern 2019





Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 2015 bis September 2019 im Institut für Toxikologie der Unimedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, im Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und im Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fahrer durchgeführt.

Eröffnung des Promotionsvorhabens: 31.10.2018

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 06.02.2020

### **Promotionskommission**

Vorsitzender: Prof. Dr. Antonio Pierik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Fahrer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

Umschlagbild: H&E-gefärbtes Kolonepithel von MGMT-defizienter Maus nach Langzeit-Häm-Eisendiät (dargestellt mit NDP.view2).

Druck und Umschlaggestaltung: Abteilung 5.6, Foto-Repro-Druck der TU Kaiserslautern.

[REDACTED]

## Zusammenfassung

Dickdarmkrebs (kolorektales Karzinom, KRK) ist die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit. Der Lebenswandel, insbesondere die Ernährungsgewohnheiten, zählen zu den bedeutendsten Risikofaktoren für KRK. Dabei steht Häm-Eisen, welches hauptsächlich durch den Verzehr von rotem Fleisch aufgenommen wird, im Verdacht, das KRK-Risiko zu erhöhen. Es wird vermutet, dass Häm-Eisen durch die Bildung endogener *N*-Nitrosoverbindungen (NOCs) und reaktiver Sauerstoffspezies sowie durch eine gesteigerte Proliferation des Kolonepithels die Entstehung des KRK fördert. NOC-induzierte Alkylierungsschäden der DNA, insbesondere mutagene *O*<sup>6</sup>-Methylguanin-Läsionen (*O*<sup>6</sup>-MeG), die durch die *O*<sup>6</sup>-MeG-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert werden, könnten in der Ätiologie von KRK von Bedeutung sein. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Häm-Eisen-vermittelten kolorektalen Kanzerogenese sind jedoch wenig verstanden und wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit lag einerseits auf der Untersuchung der Wirkung von Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom und auf intestinale Entzündungsprozesse. Andererseits wurde die Bildung kanzerogener NOCs, sowie die durch sie verursachten DNA-Schäden und die DNA-Schadensantwort bzw. -reparatur näher analysiert. Zu diesem Zweck wurden wildtypische (WT), DNA-reparaturkompetente Mäuse mit einer Häm-Eisen-haltigen Diät gefüttert, wohingegen die Kontrollgruppe eine eisenbalancierte Diät mit Zusatz von Eisencitrat erhielt. Die Rolle der DNA-Reparatur wurde durch Verwendung transgener Mäuse, die einen *Knockout* des *MGMT* Gens (*MGMT*<sup>-/-</sup>) besitzen, untersucht. Zunächst konnte beobachtet werden, dass Häm-Eisen die endogene Bildung fäkaler NOCs steigerte, was mit einer erhöhten Fäkalwasser-Zytotoxizität *in vitro* in humanen Darmepithelzellen verbunden war. Weiterhin reduzierte Häm-Eisen die Zellviabilität intestinaler Kryptorganoide *ex vivo*. *In vivo* induzierte diätisches Häm-Eisen DNA-Doppelstrangbrüche ( $\gamma$ H2AX) in intestinalen Epithelzellen, welche mit der Stabilisierung von p53 einhergingen. Zudem wurde in peripheren Blutzellen aus *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen ein Anstieg von  $\gamma$ H2AX in T-Zellen nach Häm-Eisen beobachtet. Eine Hyperproliferation des Kolonepithels durch Häm-Eisen zeigte sich als Zunahme PCNA-positiver Zellen sowie mitotischer Figuren, die zusammen mit der beobachteten reduzierten Apoptoserate einen kompensatorischen Mechanismus gegenüber den Häm-Eisen-vermittelten Schäden im Kolonepithel darstellen könnte. Die Analyse des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rRNA-Sequenzierung ergab eine Häm-Eisen-abhängige Reduktion der  $\alpha$ -Diversität sowie eine frühe intestinale Dysbiose, die über 162 Tage persistierte. Diese korrelierte mit einem Anstieg gramnegativer Bakterien, während die Abundanz der grampositiven Arten abnahm. Weiterhin wurde das intestinale Entzündungsmuster mittels nicht-invasiver Mini-

Endoskopie mit anschließender Bestimmung des Inflamationsgrades (*murine endoscopic index of colitis severity*, MEICS) analysiert. Diese Untersuchungen ergaben eine chronische Kolitis nach der Häm-Eisendiät, die zudem mit einer Aktivierung des intestinalen Immunsystems, einer Infiltration von B- und T-Zellen und einem Anstieg inflammatorischer Marker (pSTAT-3, COX-2) im Dickdarmgewebe einherging. Zur Analyse der tumorpromovierenden Eigenschaften von Häm-Eisen wurde WT Mäusen der kolonotrope Tumorinitiator Azoxymethan (AOM) verabreicht und diese in einer Langzeitstudie mit Häm-Eisen- oder Eisencitrat-haltiger Diät gefüttert. Durch die Anwendung einer Mini-Endoskopie wurde gezeigt, dass Häm-Eisen tumorpromovierend wirkt und die Anzahl sowie die Größe der AOM-induzierten Tumore erhöht. Interessanterweise wurden sogar tumorinitiiierende Eigenschaften von diätischem Häm-Eisen in MGMT<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt, wohingegen keine Initiation in WT Tieren beobachtet wurde.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass diätisches Häm-Eisen eine chronische Kolitis auslöst, die mit einer Aktivierung des intestinalen Immunsystems und einer persistierenden Dysbiose des Darmmikrobioms verbunden ist. Zusätzlich förderte Häm-Eisen kolorektale Tumore durch die beobachteten tumorpromovierenden Eigenschaften. In MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen, nicht aber in WT Mäusen, führte diätisches Häm-Eisen sogar ohne initiale AOM-Injektion zur signifikant vermehrten Entstehung kolorektaler Tumore. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Häm-Eisen bei einer Inaktivierung von MGMT, was in 40 % der sporadischen kolorektalen Karzinome beim Menschen der Fall ist, KRK sowohl initiieren als auch promovieren kann.

## Summary

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide. Lifestyle, especially nutrition, is one of the most important risk factors for CRC. Heme iron, which is mainly consumed via red meat, is suspected to increase the risk of CRC. It is thought to promote CRC development via the formation of endogenous *N*-nitroso compounds (NOCs), reactive oxygen species and an enhanced proliferation of the colonic epithelium. NOC-induced alkylation damage of DNA, in particular mutagenic O<sup>6</sup>-methylguanine lesions (O<sup>6</sup>-MeG), which are repaired by O<sup>6</sup>-MeG-DNA methyltransferase (MGMT), might be important in the etiology of CRC. However, the underlying molecular mechanisms of heme iron-mediated colorectal carcinogenesis are poorly understood and have been further investigated in this study.

The present work focused on the impact of heme iron on the intestinal microbiome and on intestinal inflammatory processes. Furthermore, the formation of carcinogenic NOCs as

well their DNA damaging properties together with the DNA damage response and repair were analysed. For this purpose, wild type (WT) DNA repair proficient mice were fed a diet containing heme iron, whereas the control group received an iron-balanced diet supplemented with iron citrate. The role of DNA repair was investigated by using transgenic mice with a knockout of the *MGMT* gene (*MGMT*<sup>-/-</sup>). First, heme iron increased endogenous formation of fecal NOCs, associated with increased fecal water cytotoxicity *in vitro* in human intestinal epithelial cells. Furthermore, heme iron reduced the cell viability of intestinal crypt organoids *ex vivo*. *In vivo*, dietary heme iron triggered DNA double-strand breaks ( $\gamma$ H2AX) in intestinal epithelial cells associated with the stabilization of p53. Additionally, peripheral blood cells from *MGMT*<sup>-/-</sup> mice showed an elevated level of  $\gamma$ H2AX-foci in T cells after heme iron. The hyperproliferation of the colonic epithelium caused by heme iron was found as an increase in PCNA-positive cells and mitotic figures, which, together with the observed reduced apoptosis rate, could represent a compensatory mechanism against heme iron-mediated damage in the colonic epithelium. Analysis of the intestinal microbiome by 16S rRNA sequencing revealed a heme iron-dependent decrease of  $\alpha$ -diversity and an early intestinal dysbiosis persisting for 162 days. This correlated with a higher number of gram-negative bacteria, while gram-positive species decreased. Furthermore, the intestinal inflammation pattern was analyzed using a non-invasive mini endoscopy with subsequent determination of the inflammation severity (murine endoscopic index of colitis severity, MEICS). These studies revealed a chronic colitis after a heme iron diet, accompanied by an activation of the intestinal immune system, an infiltration of B- and T-cells and an increase of inflammatory markers (pSTAT-3, COX-2) in the colon tissue. To analyze the tumor-promoting properties of heme iron, WT mice were injected with the colonotropic tumor initiator azoxymethane (AOM) and fed with a heme iron- or iron citrate-containing diet in a long-term study. Here, mini endoscopic analysis revealed a tumor-promoting effect of heme iron by increasing the number and size of AOM-induced tumors. Intriguingly, heme iron indicated tumor initiating properties in *MGMT*<sup>-/-</sup> animals, while no initiation was observed in WT animals.

In summary, dietary heme iron was shown to induce a chronic colitis associated with an activation of the intestinal immune system and persistent gut microbial dysbiosis. Additionally, the progression of colorectal tumors could be stimulated by the tumor-promoting potential of heme iron. In *MGMT*<sup>-/-</sup> mice, but not in WT mice, a heme iron diet resulted in colorectal tumors even without initial AOM injection, which was significantly different from WT. These results suggest that heme iron can both initiate and promote CRC when MGMT is inactivated, which occurs in 40 % of human sporadic colorectal cancers.

## Inhalt

Zusammenfassung .....	V
Summary .....	VI
Inhalt.....	VIII
Erklärungen .....	XIII
Abkürzungsverzeichnis .....	XIV
Abbildungsverzeichnis .....	XVII
Tabellenverzeichnis .....	XX
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Dickdarm: Aufbau und Funktion.....	1
1.2 Das kolorektale Karzinom.....	3
1.2.1 Allgemein.....	3
1.2.2 Darmkrebsentstehung.....	4
1.2.2.1 Molekulare Wege der kolorektalen Pathogenese und Klassifikationen .....	9
1.2.2.2 Die Beteiligung von MGMT an der Dickdarmkrebsentstehung .....	11
1.3 Ernährung und Darmkrebs .....	13
1.4 Struktur und Funktion von Häm .....	14
1.4.1 Vorkommen und gastrointestinale Resorption von (Häm-) Eisen .....	15
1.4.2 Potenzielle Mechanismen der Häm-Eisen-vermittelten KRK-Entstehung .	20
1.4.2.1 Bildung genotoxischer Substanzen durch Häm-Eisen.....	22
1.4.2.1.1 Häm-Eisen-vermittelte Bildung endogener NOCs und alkylierter DNA-Schäden .....	22
1.4.2.2 Häm-induzierte direkte oxidative DNA-Schäden und Lipidperoxidation...	25
1.4.3 Reparatur Häm-Eisen-induzierter DNA-Schäden .....	27
1.4.4 Häm-Eisen-induzierte Lipidperoxidation und Zytotoxizität .....	28
1.4.5 Häm-Eisen-vermittelte Hyperproliferation des Kolonepithels.....	29
1.4.6 Häm-Eisen in der kolorektalen Tumorgenese .....	30
1.5 Das intestinale Mikrobiom und die Beeinflussung durch (Häm-)Eisen .....	33
1.5.1 Einfluss des Mikrobioms auf die Dickdarmkrebsentstehung.....	35

---

1.6	Das intestinale Immunsystem und die mögliche Beeinflussung durch Häm-Eisen .	37
1.7	Zielsetzung .....	40
2.	Material .....	41
2.1	Geräte .....	41
2.2	Materialien .....	43
2.3	Chemikalien und Lösungen .....	44
2.4	Antikörper .....	47
2.5	Puffer und Lösungen .....	49
2.6	Mediumzusammensetzung für Kryptorganoide .....	51
2.7	Mediumzusammensetzung für HCEC .....	51
2.8	Kits .....	52
2.9	Tiere .....	52
2.10	Software .....	53
2.11	Statistische Tests .....	53
3.	Methoden .....	54
3.1	Intestinale Organoide .....	54
3.1.1	Isolation und Aussaat intestinaler Organoide .....	54
3.1.2	Behandlung intestinaler Organoide und Zelltodmessung .....	55
3.2	Behandlung humaner Kolonepithelzellen und Zelltodmessung .....	55
3.3	Generierung einer Eisen-balancierten Spezialdiät .....	56
3.4	Genotypisierung transgener Tiere .....	57
3.5	Vorbereitung von Azoxymethan für eine <i>intraperitoneale</i> Injektion .....	58
3.6	Versuchsaufbau der Eisen-balancierten Diäten .....	59
3.6.1	Kurzzeitexperimente .....	59
3.6.2	Langzeitexperimente .....	59
3.7	Blutentnahme narkotisierter Mäuse und Blutanalyse .....	60
3.7.1	Blutropfenmethode .....	60
3.8	Koloskopie narkotisierter Mäuse .....	61

3.8.1	Bewertung der Koloninflammation (Kolitisscore) mit MEICS .....	61
3.8.2	Bestimmung des Tumorscores .....	62
3.9	Entnahme und Aufarbeitung von Organen.....	63
3.10	Nachweis der Eisenaufnahme in murines Kolongewebe mittels ICP-MS/MS	64
3.11	Isolation intestinaler <i>Lamina propria</i> und intraepithelialer Lymphozyten .....	65
3.12	Immunhistochemie .....	66
3.12.1	Probenvorbereitung für IHC .....	66
3.12.1.1	Immunfluoreszenz .....	67
3.12.1.2	Konfokale Mikroskopie.....	68
3.12.2	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Deoxyuridine-Triphosphat (DUTP Nick end labeling (TUNEL-Assay))</i> .....	68
3.13	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung .....	69
3.14	Proteinlysate aus Kolongewebe .....	71
3.14.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	71
3.14.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	71
3.14.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	71
3.14.2.2	Wet-Blot Transfer.....	72
3.14.2.3	Immunodetektion .....	73
3.14.2.4	Strippen der Membran: pH-Methode.....	74
3.15	DNA-Isolation und Bestimmung der O <sup>6</sup> -MeG-Läsionen .....	74
3.15.1	DNA-Isolation mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol .....	74
3.15.2	Bestimmung der O <sup>6</sup> -MeG-Läsionen mittels Immuno-Slot-Blot.....	75
3.16	Mikrobiomanalysen .....	75
3.16.1	Isolation der bakteriellen genomischen DNA für Mikrobiomanalysen .....	76
3.16.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Qubit .....	77
3.16.2	<i>Next generation sequencing (NGS)</i> der Mikrobiomproben .....	77
3.17	Herstellung des Fäkalwassers und Analysen .....	78
3.17.1	Herstellung von Fäkalwasser aus Kotproben .....	78
3.17.2	Bestimmung der fäkalen Nitrosoverbindungen.....	78



---

3.17.3	Messung der NOC-induzierten Fäkalwasserzytotoxizität.....	79
4.	Ergebnisse .....	80
4.1	Genotypisierung der MGMT-defizienten Mäuse.....	80
4.2	Intestinale Aufnahme von Eisencitrat im Vergleich zu Häm-Eisen .....	80
4.3	Analyse der Häm-Eisen-vermittelten Bildung endogener NOCs .....	83
4.3.1	Anstieg fäkaler NOCs nach Häm-Eisen-haltiger Diät.....	83
4.3.2	Einfluss von Häm-Eisen auf die Bildung von O <sup>6</sup> -Methylguanin im Kolon ..	85
4.4	Luminale Toxizität von Fäkalwasser nach Häm-Eisendiät .....	87
4.5	DNA-Schadensinduktion nach Häm-Eisen-Fütterung .....	90
4.5.1	Nachweis von DNA-Schäden im Kolonepithel mittels Immunhistochemie	90
4.5.2	Nachweis von DNA-Schäden nach Häm-Eisen mittels Western Blot.....	92
4.5.3	Häm-induzierte DNA-Schäden in peripheren Blutzellen .....	94
4.6	Häm-Eisen-vermittelte Steigerung der intestinalen Proliferation .....	96
4.7	Häm-Eisen hemmt die Apoptose-Induktion im Kolonepithel.....	97
4.8	Häm-Eisen-vermittelte intestinale Inflammation .....	101
4.8.1	Häm-Eisen-bedingte Veränderung der intestinalen Immunzellen .....	110
4.9	Einfluss von diätischem Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom .....	120
4.10	Rolle von Häm-Eisen bei der Tumorinitiation und Tumorprogression.....	130
4.10.1	Effekt einer Langzeitdiät mit Häm-Eisen auf das Kolonepithel in Abhängigkeit vom MGMT-Status.....	130
4.10.2	Einfluss von Häm-Eisen auf die Promotion von Kolontumoren in WT Mäusen .....	133
5.	Diskussion.....	137
5.1	Intestinale Aufnahme von Häm-Eisen in das murine Kolonepithel .....	137
5.2	Häm-Eisen fördert fäkale ATNCs mit potenzieller O <sup>6</sup> -MeG-Bildung im Kolon .....	138
5.3	Häm-Eisen induziert DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert die DNA-Schadensantwort .....	141
5.4	Zytotoxisches Potenzial einer Häm-Eisendiät auf Kolonepithelzellen.....	145

5.5	Hyperproliferation und Apoptosehemmung als kompensatorische Mechanismen der Häm-induzierten Schäden .....	147
5.6	Häm-Eisen induziert eine chronische Entzündung im Kolonepithel.....	149
5.7	Häm-Eisen induziert eine Dysbiose des intestinalen Mikrobioms .....	159
5.8	Häm-Eisen zeigt tumorinitiierende und -promovierende Eigenschaften .....	164
6.	Ausblick .....	169
	Anhang .....	171
	Danksagung.....	200
	Lebenslauf .....	201
	Publikationsliste .....	202
	Kongressteilnahme .....	203
	Literaturverzeichnis .....	204

## Erklärungen

Hiermit erkläre ich, Nina Susanne Seiwert, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von MGMT in der Häm-Eisen-vermittelten kolorektalen Kanzerogenese“ selbstständig verfasst und dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor der Erstellung dieser Dissertation auf Kongressen veröffentlicht (siehe Kongressteilnahme). Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 07. Oktober 1999 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den

---

Nina Susanne Seiwert

## Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
×g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
15-PGDH	15-Hydroxyprostaglanin-Dehydrogenase
4-HNE	4-Hydroxynonenal
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APC	<i>adeonmatous polyposis coli</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectatica</i>
ATNCs	<i>apparent total nitroso compounds</i> , Gesamtheit der Nitrosoverbindungen
BDM	Blutropfenmethode
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
CDT	<i>cytolethal distending toxin</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHF	<i>cytotoxic heme factor</i> , zytotoxischer Häm-Faktor
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i> , CpG-Inseln methylierender Phänotyp
c-Myc	cellular myelocytomatosis
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Desoxycytidin (C)-Phosphorsäure (p)-Desoxyguanosin (G)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DDR	<i>DNA damage response</i> , <i>DNA-Schadensantwort</i>
DHN-MA	1,4 Dihydroxynonan Mercaptursäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced</i> Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i> , familiäres adenomatöses Polyposis Syndrom
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fötales Kälberserum
Fe	Eisen
FeCl <sub>3</sub>	Eisen(III)Chlorid
Fe-NOs	Nitrosyl-Eisenverbindungen
G	Guanin
g	Gramm
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i> , Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
h	<i>hora</i> , Stunde
HAA	heterozyklische aromatische Amine
HCEC	<i>human colonic epithelial cells</i> , humane Kolonepithelzellen

HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
<i>hMLH1</i>	humanes mutL-Homolog 1
HO-1	Hämoxygenase 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
IARC	<i>international Agency for Research on Cancer</i>
ICP-MS/MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IE	Intraepithelium
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
<i>Ier3</i>	<i>immediate early response 3</i>
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KRK	Kolorektalkrebs
l	Liter
$L^{\cdot}$	Lipidradikal
$IN_2$	<i>liquid nitrogen</i> , Flüssigstickstoff
$LOO^{\cdot}$	Lipidperoxidradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
LP	Lämmli-Ladepuffer
LP	<i>Lamina Propria</i>
LPL	<i>Lamina Propria</i> Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
$M_1dG$	1, <i>N</i> <sup>2</sup> -Malondialdehyd-Deoxyguanosin
MDA	Malondialdehyd
MEICS	<i>Murine Endoscopic Colitis Severity</i>
MeOH	Methanol
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA Methyltransferase
min	Minuten
ml	Milliliter
MLH	MutL homologes Protein
mM	Millimolar
MMR	<i>mismatch repair</i> , DNA-Basenfehlpaarungsreparatur
MSH	MutS homologes Protein
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
n	Anzahl der (unabhängig) durchgeführten Experimente/Anzahl der Individuen
<i>N</i> <sup>1</sup> -MeA	<i>N</i> <sup>1</sup> -Methyladenin
<i>N</i> <sup>3</sup> -MeC	<i>N</i> <sup>3</sup> -Methylcytosin
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NOC	<i>N-Nitroso Compounds</i> , Nitrosoverbindungen
NO-Häm	Nitrosyl-Häm

Nrf2	<i>nuclear transcription factor-erythroid 2-related factor</i>
O <sup>6</sup> -BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
O <sup>6</sup> -CMG	O <sup>6</sup> -Carboxymethylguanin
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
OTUs	<i>operational taxonomic units</i> , operationelle taxonomische Einheiten
p	Phosphorylierung
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PI3KCA	Phosphoinositid-3-Kinasen katalytische Einheit
pos.	positiv
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrungesättigte Fettsäuren
Ripk3	Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3
RNA	Ribunukleinsäure
RNNOs	<i>N</i> -Nitrosoverbindungen
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RSNOs	Nitrosothiole
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
S <sub>N</sub> 1	nucleophile Substitution erster Ordnung
spp.	Spezies, nicht bestimmte Arten einer Gattung
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Strep	Streptavidin
T	Thymin
TBA	<i>thiobarbituric acid</i> , Thiobarbitursäure
TBARS	TBA-reaktive Substanzen
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TCF4	<i>T cell transcription factor 4</i> , T-Zell Transkriptionsfaktor 4
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGFBR II	TGFβ Rezeptor II
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMZ	Temozolomid
TNBS	Trinitrobenolsulfonsäure
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling</i>
u.a.	unter anderem
UPLC-MS/MS	<i>ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
v.a.	vor allem

vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
$\gamma$ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Anatomie des Kolons und Aufbau der Kolonwand.</b>	2
<b>Abbildung 2: Verteilung der Inzidenz von Krebserkrankungen (A) und krebisbedingte Mortalität (B) weltweit. Modifiziert nach (UICC, 2018).</b>	4
<b>Abbildung 3: Gene und Wachstumsfaktoren, die die KRK-Progression beeinflussen.</b>	5
<b>Abbildung 4: Die Rolle von MGMT in der kolorektalen Kanzerogenese.</b>	12
<b>Abbildung 5: Röntgenstrukturanalyse von humanem Oxyhämoglobin.</b>	15
<b>Abbildung 6: Intestinale Aufnahme von anorganischem vs. Häm-Eisen in Enterozyten.</b>	18
<b>Abbildung 7: Häm-Eisen-induzierte potenzielle DNA-Schäden.</b>	21
<b>Abbildung 8: Metabolische Aktivierung von NOCs und die Induktion von DNA-Schäden.</b>	24
<b>Abbildung 9: Fenton-Reaktion.</b>	26
<b>Abbildung 10: Das Darm-assoziierte Immunsystem.</b>	38
<b>Abbildung 11: Strukturformel Hämin.</b>	56
<b>Abbildung 12: Versuchsaufbau der Kurzzeitexperimente.</b>	59
<b>Abbildung 13: Versuchsaufbau der Langzeitexperimente.</b>	60
<b>Abbildung 14: Bestimmungsparameter zur Ermittlung des MEICs und repräsentative Aufnahmen.</b>	62
<b>Abbildung 15: Endoskopische Bewertung der Tumorentwicklung.</b>	62
<b>Abbildung 16: Einteilung des Kolons in verschiedene Abschnitte zur Analyse.</b>	63
<b>Abbildung 17: Übersicht der Langzeitexperimente für Mikrobiomanalysen.</b>	76
<b>Abbildung 18: Repräsentative Aufnahme einer MGMT-Genotypsierungs-PCR.</b>	80
<b>Abbildung 19: Intestinale Eisenaufnahme ins Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	82
<b>Abbildung 20: Messung fäkaler NOCs in WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21 und 162 Tagen.</b>	84
<b>Abbildung 21: Untersuchung der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen in genomischer DNA von WT Mäusen.</b>	86
<b>Abbildung 22: Untersuchung der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen in genomischer DNA von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	87
<b>Abbildung 23: Häm-Eisen-induzierte Fäkalwasserzytotoxizität in Kolonepithelzellen.</b>	88
<b>Abbildung 24: Häm-Eisen-induzierte Zytotoxizität in intestinalen Organoiden und Kolonepithelzellen.</b>	90
<b>Abbildung 25: IHC-Analyse von <math>\gamma</math>H2AX im Kolonepithel beider Genotypen nach 21 Tagen Diät.</b>	91
<b>Abbildung 26: Western Blot Analyse von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21 Tagen Fütterung.</b>	93
<b>Abbildung 27: Western Blot Analyse von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 162 Tagen Fütterung.</b>	94
<b>Abbildung 28: Untersuchung der DNA-Schäden in peripheren T-Lymphozyten.</b>	95

<b>Abbildung 29: IHC-Färbung von PCNA im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	97
<b>Abbildung 30: Messung der Apoptose-Induktion im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	98
<b>Abbildung 31: IHC-Analyse der Spaltung von Caspase 3 im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Tieren.</b>	100
<b>Abbildung 32: Analyse der Kolitis (MEICS) nach Eisencitrat oder Häm-Eisen in WT und MGMT<sup>-/-</sup>.</b>	102
<b>Abbildung 33: Repräsentative Aufnahmen der Koloskopie und H&amp;E-Färbungen.</b>	103
<b>Abbildung 34: Kryptenlängen nach Eisencitrat- und Häm-Eisendiät.</b>	104
<b>Abbildung 35: IHC-Analyse von Makrophagen und COX-2-positiven Zellen.</b>	106
<b>Abbildung 36: IHC-Analyse des Kolonepithels von pSTAT-3.</b>	108
<b>Abbildung 37: Nachweis von CD3-positiven Zellen im Kolon von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	109
<b>Abbildung 38: Einfluss von Häm-Eisen auf die IEL und LPL im Kolon von WT Mäusen.</b>	111
<b>Abbildung 39: Einfluss von Häm-Eisen auf verschiedene intestinale T-Zellpopulationen in WT Mäusen.</b>	112
<b>Abbildung 40: Analyse der myeloiden Immunzellen innerhalb der LP und im IE.</b>	114
<b>Abbildung 41: Einfluss von Häm-Eisen auf die Lymphozytenzahl der LPL und IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	115
<b>Abbildung 42: Einfluss von Häm-Eisen auf intestinale T-Zellpopulationen von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	117
<b>Abbildung 43: Analyse der myeloiden Immunzellen innerhalb der LP und des IE im Kolon von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	119
<b>Abbildung 44: Analyse der <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Diversität in WT Mäusen.</b>	122
<b>Abbildung 45: Einfluss von Häm-Eisen auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms.</b>	124
<b>Abbildung 46: Taxonomische Analysen des intestinalen Mikrobioms in WT Mäusen.</b>	126
<b>Abbildung 47: Einfluss von Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom in AOM-behandelten Mäusen.</b>	128
<b>Abbildung 48: Einfluss einer Langzeit-Häm-Eisendiät auf das Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.</b>	131
<b>Abbildung 49: Histopathologische Veränderungen der Kolonmukosa von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren nach Langzeitdiät.</b>	132
<b>Abbildung 50: MEICS von AOM-injizierten WT Mäusen nach Langzeitfütterung.</b>	134
<b>Abbildung 51: Effekt einer Langzeitfütterung mit Häm-Eisen auf das Kolonepithel AOM-initiiertes WT Mäuse.</b>	135
<b>Abbildung 52: Übersicht der potenziellen tumorinitiiierenden/-promovierenden Mechanismen von Häm-Eisen.</b>	168



<b>Abbildung 53: Histopathologische Untersuchung des Kolonepithels nach 21-tägiger Häm-Eisendiät.....</b>	<b>173</b>
<b>Abbildung 54: Histopathologische Untersuchung des Kolonepithels nach 162-tägiger Häm-Eisendiät.....</b>	<b>174</b>
<b>Abbildung 55: Eisenaufnahme und HO-1 im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup>.....</b>	<b>174</b>
<b>Abbildung 56: statistischer Vergleich der fäkalen NOCs zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen. .....</b>	<b>175</b>
<b>Abbildung 57: Vergleich der Fäkalwasserzytotoxizität aus WT und MGMT<sup>-/-</sup> in Kolonepithelzellen.....</b>	<b>175</b>
<b>Abbildung 58: Vergleichende Analyse zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> nach Eisencitrat und Häm- Eisen. ....</b>	<b>176</b>
<b>Abbildung 59: Statistischer Vergleich der γH2AX-Foci in peripheren Blutzellen von WT und MGMT<sup>-/-</sup>.....</b>	<b>176</b>
<b>Abbildung 60: Statistischer Vergleich des Entzündungsgrades der Kolitis zwischen den Genotypen.....</b>	<b>177</b>
<b>Abbildung 61: Vergleich der mittels IHC-bestimmten Inflammationsmarker zwischen den Genotypen.....</b>	<b>177</b>
<b>Abbildung 62: Vergleichende Analyse intestinaler Lymphozyten zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup>. .....</b>	<b>178</b>
<b>Abbildung 63: Vergleichende Analyse intestinaler myeloider Immunzellen zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup>.....</b>	<b>178</b>
<b>Abbildung 64: Vergleichende Analyse der Mikrobiota von WT Mäusen mit und ohne AOM- Injektion.....</b>	<b>179</b>
<b>Abbildung 65: Einfluss einer initialen AOM-Injektion und Spezialdiäten auf das intestinale Mikrobiom.....</b>	<b>180</b>
<b>Abbildung 66: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.1). ....</b>	<b>181</b>
<b>Abbildung 67: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.1). ....</b>	<b>182</b>
<b>Abbildung 68: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.3). ....</b>	<b>183</b>
<b>Abbildung 69: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 2 S.1). ....</b>	<b>184</b>
<b>Abbildung 70: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 2 S.2). ....</b>	<b>185</b>
<b>Abbildung 71: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.1). ....</b>	<b>186</b>
<b>Abbildung 72: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.2). ....</b>	<b>187</b>
<b>Abbildung 73: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.3). ....</b>	<b>188</b>
<b>Abbildung 74: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 2 S.1). ....</b>	<b>189</b>
<b>Abbildung 75: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 2 S.2). ....</b>	<b>190</b>
<b>Abbildung 76: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.1). ....</b>	<b>191</b>
<b>Abbildung 77: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.2). ....</b>	<b>192</b>
<b>Abbildung 78: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.3). ....</b>	<b>193</b>
<b>Abbildung 79: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.1). ....</b>	<b>194</b>

<b>Abbildung 80: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.2).</b>	195
<b>Abbildung 81: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.1).</b>	196
<b>Abbildung 82: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.2).</b>	197
<b>Abbildung 83: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.1).</b>	198
<b>Abbildung 84: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.2).</b>	199

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Molekulare Klassifizierung kolorektaler Karzinome.</b>	10
<b>Tabelle 2: Übersicht der Häm-Eisen-Mengen in Fleisch in mg/100 g (Frischgewicht).</b>	16
<b>Tabelle 3: Einfluss von diätischem Häm auf die Entstehung von Darmtumoren.</b>	32
<b>Tabelle 4: Geräte</b>	41
<b>Tabelle 5: Materialien</b>	43
<b>Tabelle 6: Chemikalien und kommerzielle Lösungen.</b>	44
<b>Tabelle 7: Primärantikörper.</b>	47
<b>Tabelle 8: Sekundärantikörper.</b>	48
<b>Tabelle 9: Antikörperliste für IEL/LPL</b>	48
<b>Tabelle 10: Puffer und Lösungen.</b>	49
<b>Tabelle 11: Medien und Zusätze für Kryptorganoide.</b>	51
<b>Tabelle 12: Medien und Zusätze für HCEC</b>	51
<b>Tabelle 13: Kits</b>	52
<b>Tabelle 14: verwendete Software.</b>	53
<b>Tabelle 15: Genotypisierungsprimer.</b>	57
<b>Tabelle 16: PCR-Komponenten für MGMT-Genotypisierung.</b>	57
<b>Tabelle 17: PCR Programm für MGMT-Genotypisierung</b>	58
<b>Tabelle 18: Programm des automatisierten Gewebeinfiltrationsautomaten.</b>	64
<b>Tabelle 19: Parameter für ICP-MS/MS-Messung</b>	65
<b>Tabelle 20: Entparaffinieren und Rehydrierung von Kolongewebeschnitten für IHC.</b>	66
<b>Tabelle 21: Dauer der Epitop-Demaskierung und Antikörperverdünnungen für IHC</b>	67
<b>Tabelle 22: Exzitations-/Emissionswellenlänge der verwendeten Fluorophore.</b>	68
<b>Tabelle 23: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten für Histologie</b>	70
<b>Tabelle 24: H&amp;E-Färbung und Dehydrierung von Paraffinschnitten für Histologie</b>	70
<b>Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.</b>	72
<b>Tabelle 26: Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blot.</b>	73
<b>Tabelle 27: Häm-Eisen-bedingte Änderung der Immunzellpopulationen im Kolon und deren Bedeutung.</b>	158
<b>Tabelle 28: Futterzusätze der Spezialdiät von Altromin.</b>	171

# 1. Einleitung

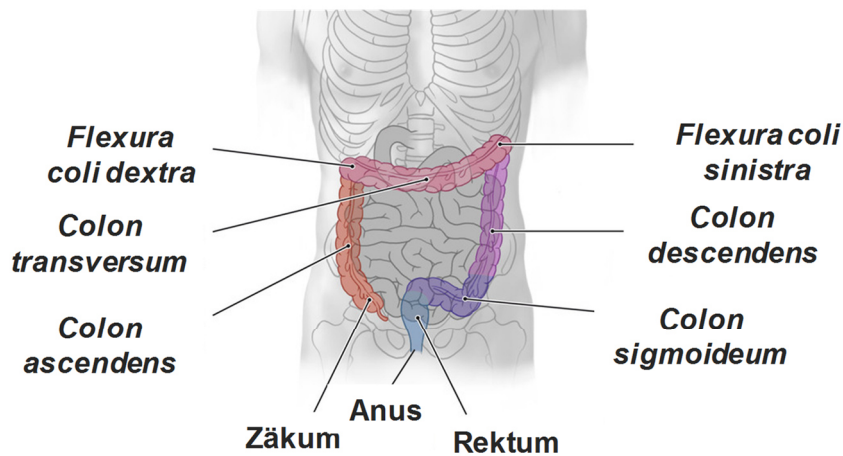
## 1.1 Der Dickdarm: Aufbau und Funktion

Der Dickdarm gliedert sich in das Zäkum (Blinddarm), Kolon und Rektum (Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015). Das Kolon ist ein ca. 1,3 m langes muskuläres Hohlorgan des Verdauungstraktes mit einer epithelialen Auskleidung, welches am proximalen Ende an das Zäkum und am distalen Ende an das Rektum anschließt. Es kann grob in vier Abschnitte unterteilt werden: proximal grenzt das *Colon ascendens* an das Zäkum, geht dann über in das *Colon transversum*, das *Colon descendens* und mündet über das *Colon sigmoidales* in das Rektum (Aumüller *et al.*, 2017; Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015). Der Übergang zwischen dem *Colon ascendens* und dem *Colon transversum* wird *Flexura coli dextra* genannt. Zwischen dem *Colon transversum* und dem *Colon descendens* befindet sich die *Flexura coli sinistra* (Aumüller *et al.*, 2017; Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015). Auf das 15-16 cm lange Rektum folgt der Analkanal und schließlich der Anus. Der *Musculus sphincter ani internus* und der *Muculus levator ani* kleiden den Analkanal aus und bilden zusammen mit einem Schwellkörper, dem *Corpus cavernosum recti*, und weiteren Strukturen das Kontinenzorgan, das für die Defäkation verantwortlich ist. Das Kontinenzorgan besteht aus einem dehnbaren Hohlorgan und sorgt für einen gasdichten Verschluss des Rektums. Während das Epithel proximal ein Zylinderepithel darstellt, geht es distal in ein Plattenepithel über (Abb. 1 A (Schulte *et al.*, 2005)).

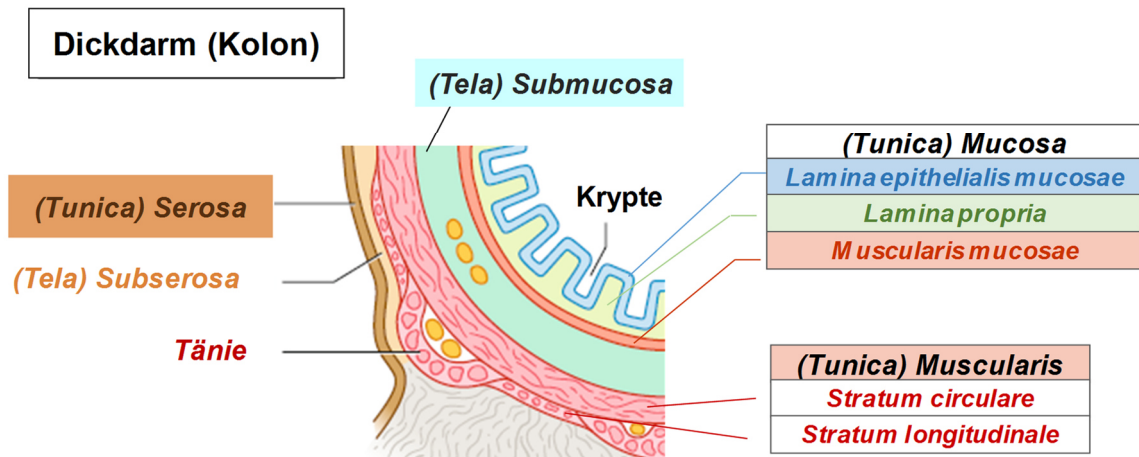
In Abb. 1 B ist der Aufbau der Kolonwand dargestellt. Die Schleimhaut des Kolons wird auch *Tunica mucosa* genannt und besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel, der *Lamina epithelialis*, der *Lamina propria* und der *Lamina muscularis mucosae* und stellt die innerste Schicht des Kolons dar. Daran schließt sich eine lockere Bindegewebsschicht namens *Tela submucosa* an, die auf der *Tunica muscularis* liegt. Die *Tunica muscularis* besteht aus einer Ring- (*Stratum circulare*) und einer Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*), die für die typische peristaltische Bewegung des Darms verantwortlich ist. Die Längsmuskelschicht bildet drei makroskopisch sichtbare bandartige Züge aus, die Tänen. Die *Tunica serosa* stellt die äußerste Schicht des Kolons dar und wird durch die *Tela subserosa*, eine weitere Bindegewebsschicht, von der *Tunica muscularis* getrennt (Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu der Mukosa des Dünndarms besteht die des Dickdarms nur aus Krypten. Das Epithel ist an der Oberfläche und in den Krypten mit Saumzellen mit kurzen Mikrovilli, sogenannten Kolonozyten, ausgekleidet. Zudem ist das Epithel reich an Muzin-produzierenden Becherzellen, wohingegen endokrine und Paneth-Zellen nur vereinzelt im Kolon vorkommen. Die Paneth-Zellen sind die Drüsenzellen, durch

deren Sekretion von Abwehrstoffen u.a. die lokale Immunabwehr bewerkstelligt wird (Aumüller *et al.*, 2017; Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015).

A)



B)



**Abbildung 1: Anatomie des Kolons und Aufbau der Kolonwand.**

A) Lage und Aufbau der Kolonanatomie. Modifiziert nach (Schünke *et al.*, 2009). B) Aufbau der Kolonmukosa. Modifiziert nach (Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015).

Die von den Becherzellen produzierten Muzine bilden eine physikalische Barriere gegen die im Kolon befindlichen, kommensalen Bakterien und dienen dem mechanischen Schutz der Epithelzellen durch den sogenannten Gleitschleim. Die an der Kryptenbasis sitzenden LGR-5<sup>+</sup> Stammzellen bewerkstelligen die Zellerneuerung und differenzieren sich zu den unterschiedlichen Zelltypen aus. Dabei wandern die Zellen zum Oberflächenepithel der Kolonozyten, wo sie durch Apoptose absterben und ins Lumen abgegeben werden (Aumüller *et al.*, 2017; Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015).

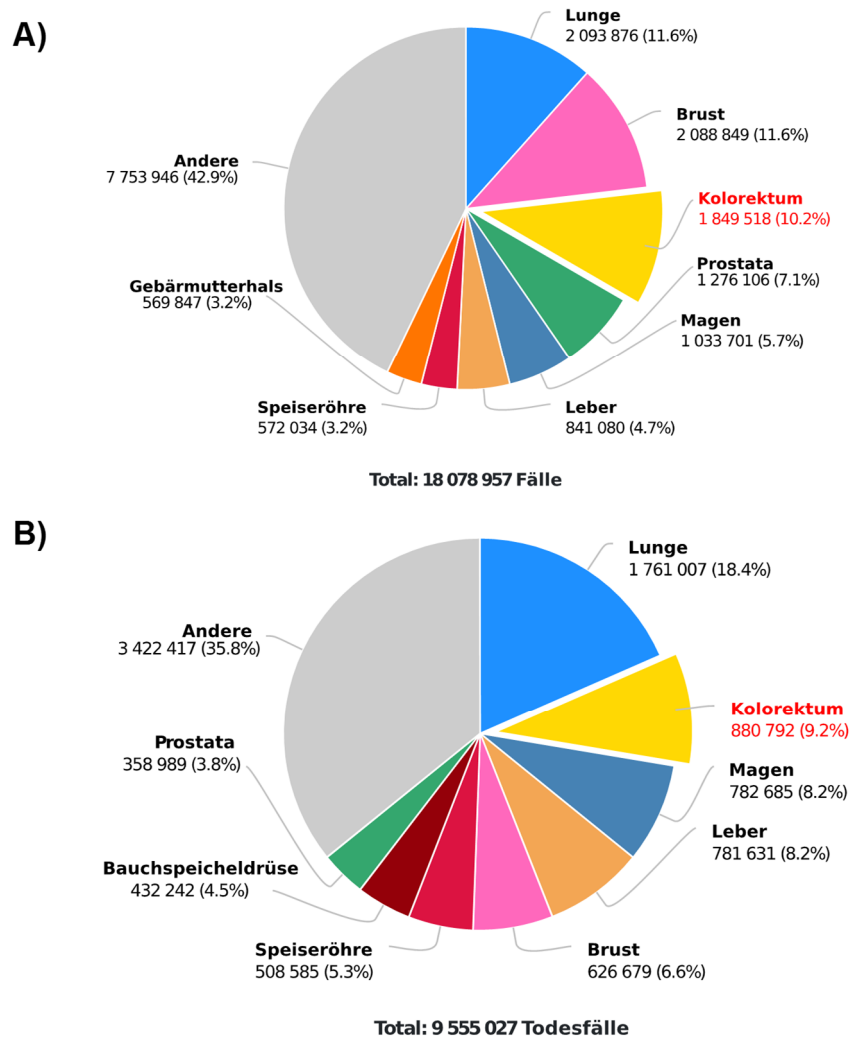
Die *Lamina propria* (LP) besteht aus einem lockeren kollagenen Bindegewebe und kann vereinzelt Lymphfollikel enthalten. Sie liegt unterhalb der Epithelzellen und beinhaltet viele Blut- und Lymphgefäße. Die darin enthaltenen LP Lymphozyten (LPL) bilden zusammen mit den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) den Abwehrmechanismus des Kolons. Zusätzlich produzieren die im *Colon ascendens* vereinzelt vorkommenden Paneth-Zellen antimikrobielle Peptide (Defensine) und tragen zur Aufrechterhaltung des Immunsystems bei (siehe 1.6 (Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015)).

Durch die massive Oberflächenvergrößerung des Kolons wird die grundlegende Funktion der Wasserresorption erleichtert und somit der Speisebrei, auch Chymus genannt, eingedickt. Dies geschieht über die Rückresorption von Natrium über einen  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Austausch, bei dem Kalium ins Darmlumen abgegeben wird. Die im Dickdarm vorkommenden meist anaeroben kommensalen Bakterien spielen z.B. beim Aufschluss von unverdauten Nahrungsbestandteilen sowie der Produktion von Vitamin K eine bedeutende Rolle (1.6). Vitamin K wird in der Leber benötigt, um Gerinnungsfaktoren zu bilden (Aumüller *et al.*, 2017).

## 1.2 Das kolorektale Karzinom

### 1.2.1 Allgemein

Tumorerkrankungen gehören mit geschätzten 9,6 Millionen Toten im Jahr 2018 zu den Haupttodesursachen weltweit. Darunter wird Kolorektalkrebs (KRK), neben Lungen- (2,094 Millionen) und Brustkrebs (2,089 Millionen), mit 1,8 Millionen Fällen als dritthäufigste Krebserkrankung gezählt. In Abb. 2 sind die Verteilungen der Krebserkrankungen (A) und Krebsmortalität (B) nach Häufigkeit aufgelistet. Mit 880792 Todesfällen wurde 2018 KRK als die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit eingestuft (UICC, 2018). Das Darmkrebsrisiko korreliert dabei mit einer Vielzahl an Risikofaktoren. Dazu zählen Fettleibigkeit, der Verzehr von prozessiertem und rotem Fleisch, ein geringer Verzehr von Obst und Gemüse und ein Mangel an sportlicher Aktivität. Daneben spielen genetische Prädispositionen wie beim Lynch- und FAP-Syndrom (*familial adenomatous polyposis*), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED, wie *Morbus Crohn* und *Colitis Ulcerosa*) und das Rauchen eine wichtige Rolle in der Ätiologie von KRK (Johnson *et al.*, 2013).

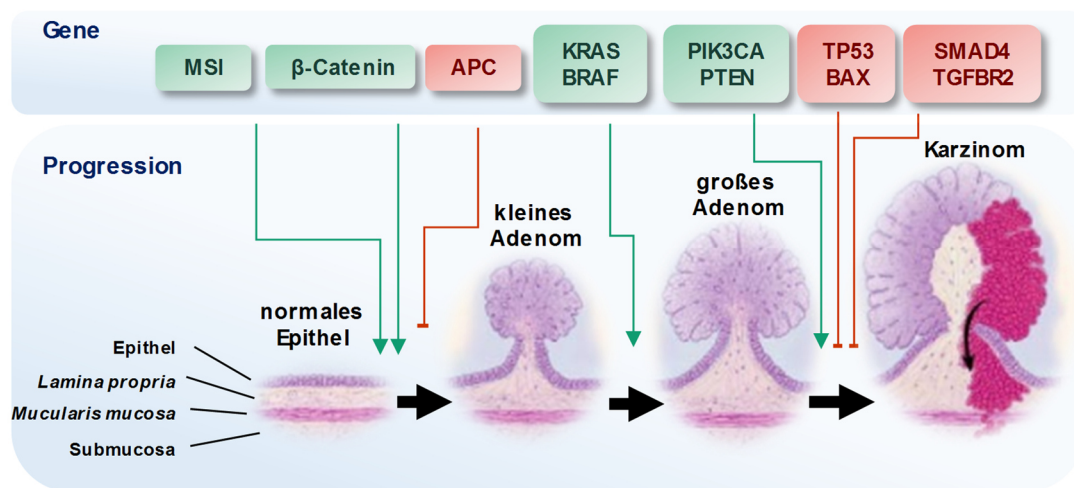


**Abbildung 2: Verteilung der Inzidenz von Krebserkrankungen (A) und krebisbedingte Mortalität (B) weltweit.** Modifiziert nach (UICC, 2018).

### 1.2.2 Darmkrebsentstehung

Bereits 1988 beschrieb Bert Vogelstein die genetischen Veränderungen der kolorektalen Kanzerogenese in einem Mehrstufenmodell, das in den letzten Jahren durch weitere Studien vervollständigt wurde (Markowitz *et al.*, 2009; Vogelstein *et al.*, 1988) (Abb. 3). In dem sogenannten „Vogelsteinmodell“ oder „Mehrstufenmodell der Kolonkanzerogenese“ entstehen durch Mutationen von Darmepithelzellen dysplastische Zellen, die akkumulieren und langsam einen gutartigen, adenomatösen Polypen bilden. Durch weitere Mutationen in Tumorsuppressor- und/oder Onkogenen entwickelt sich daraus ein malignes, metastasierendes Karzinom (Rajagopalan *et al.*, 2003). Man unterteilt die einzelnen Schritte der Krebsentstehung allgemein in die Initiations-, Promotions- und Progressionsphase (Barrett *et al.*, 1987; Siddiqui *et al.*, 2015). In der Initiationsphase kommt es zu Alterationen oder Mutationen, die spontan oder durch die Exposition mit

kanzerogenen Substanzen induziert werden. Dabei bewirken diese genetischen Alterationen eine Dysregulation von Signalwegen, die häufig in Prozessen wie Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung beteiligt sind (Siddiqui *et al.*, 2015). Die Promotionsphase ist ein relativ langer und reversibler Prozess, in dem es zur Akkumulation proliferierender präneoplastischer Zellen kommt. Die Phase zwischen einer prämaligen Läsion und der Entwicklung eines invasiven Karzinoms wird Progression genannt. Hierbei handelt es sich um die letzte Stufe der neoplastischen Transformation, in der genetische und phänotypische Veränderungen die Tumorgroße erhöhen und durch weitere Mutationen ein invasives metastasierendes Potenzial entwickelt wird (Siddiqui *et al.*, 2015). Abb. 3 zeigt Gene und Wachstumsfaktoren, die bei der Progression kolorektaler Tumore beteiligt sind.



**Abbildung 3: Gene und Wachstumsfaktoren, die die KRK-Progression beeinflussen.**

Modifikation der Gene, die bei der Initiation und Progression von KRK eine Rolle spielen. Der Signalweg der Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) wird durch Genmutationen der Fehlpaarungsreparatur (MMR) oder aberrante MLH1-Methylierung initiiert. Das ist zudem mit nachgeschalteten Mutationen in *TGFBR2* und *BAX* assoziiert. Des Weiteren spielen Mutationen in *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* und *PIK3CA* eine wichtige Rolle in der Progression von KRK. Grüne Pfeile stellen onkogene Prozesse und rote Blockaden tumorsuppressive Mechanismen dar. Modifiziert nach (Markowitz *et al.*, 2009).

Der Initiation von Darmkrebs liegt häufig ein DNA-Schaden zugrunde, der durch *loss-of-function*-Mutationen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder durch *gain-of-function*-Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen führt. Ein entscheidendes Ereignis im frühen Stadium der Dickdarmkrebsentstehung ist die irreversible Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *adenomatous polyposis coli* (*APC*) (Markowitz *et al.*, 2009; Tanaka, 2009). Diese inaktivierende Mutation im *APC*-Gen spielt sowohl bei der sporadischen als auch der familiären (FAP-Syndrom) kolorektalen Karzinogenese eine entscheidende Rolle. Wildtypisches *APC*-Protein ist für den Abbau des Onkogens *β-Catenin* verantwortlich und sorgt v.a. durch die Unterdrückung der transkriptionellen Signalgebung für die Homöostase



der WNT-abhängigen Prozesse. APC ist essentiell für die Regulierung der Aktivität des WNT-Signalweges (Korinek *et al.*, 1997; Markowitz *et al.*, 2009; Morin *et al.*, 1997). Dieser Signalweg wird durch die Bindung des Cadherin-Bindeproteins  $\beta$ -Catenin an den *T cell transcription factor 4 (TCF4)* aktiviert, wodurch Gene induziert werden, die wiederum für die Aktivierung mitogener Gene (z.B. *c-Myc*, *Cyclin D1*) notwendig sind (Goss *et al.*, 2000; Korinek *et al.*, 1997; Markowitz *et al.*, 2009; Morin *et al.*, 1997). Der Promotor von *c-Myc* (*cellular myelocytomatosis*, zelluläre Myelocytomatose), einem weiteren Onkogen, besitzt eine solche TCF-Bindestelle und ist damit ein Ziel dieses Signalweges. Die Expression von *c-Myc* wird durch wildtypisches APC unterdrückt und kontrolliert somit die *c-Myc*-vermittelte Zellproliferation, wohingegen mutiertes APC eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und damit eine verstärkte Zellproliferation bewirkt (He *et al.*, 1998).

Des Weiteren ist die Initiation von KRK häufig mit Defekten in Genen der DNA-Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*, MMR) verknüpft. Bereits Mutationen in nur einem der vier MMR-Gene bewirken den kompletten Aktivitätsverlust der MMR, wie es z.B. bei erblichen Keimbahndefekten des Lynch-Syndroms (*hereditary non polyposis colorectal cancer*) oder sporadisch durch Inaktivierungen im somatischen wildtypischen Allel vorkommt. Diese Inaktivierung kann sowohl durch eine *loss-of-function*-Mutation in mikrosatellitenkodierenden MMR-Genen sowie durch Methylierung von CpG (Desoxycytidin (C)-Phosphorsäure (p)-Desoxyguanosin (G))-reichen Stellen in der Promotorregion dieser Gene erfolgen (Boland *et al.*, 2008). Am häufigsten treten dabei Mutationen in den Genen *hMLH1* (humanes mutL-Homolog 1) und *hMSH2* (humanes mutS-Homolog 2) auf, was mit einer erhöhten Mikrosatelliteninstabilität (MSI) einhergeht (Boland *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 1994). Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen, die bei Verlust der Reparaturkapazität häufig mutieren, wodurch es zur Längenänderung innerhalb der Mikrosatelliten, der sogenannten MSI, kommt (Boland *et al.*, 2008; Markowitz *et al.*, 2009). Bei MMR-Defekten sind oft Tumorsuppressorgene, wie der Rezeptortyp II des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$  receptor type II*, TGFBRII) und bcl-2-assoziierte X-Proteine (BAX) betroffen (Markowitz *et al.*, 2009). KRK-bedingte Mutationen im TGFBRII-Gen, welches in der Aktivierung von SMAD (*small mothers against decapentaplegic*)-Proteinen involviert ist, sind häufig mit Mutationen von SMAD4-Genen verbunden. Diese Mutationen werden zu den späten Ereignissen der Tumorprogression gezählt (Isaksson-Mettavainio *et al.*, 2006; Villalba *et al.*, 2017).

Die frühesten Veränderungen der Kolonmukosa in der Darmkrebsentstehung sind die sogenannten aberranten Kryptenfoci (*aberrant crypt foci*, ACF) (Nucci *et al.*, 1997; Tanaka,



2009). Diese Vorläuferläsionen sind morphologische Veränderungen der Kolonmukosa und weisen meist eine erhöhte Proliferationsrate und genetische Veränderungen wie eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin sowie somatische Mutationen in den Genen *APC* und *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) auf (Nucci *et al.*, 1997; Ochiai *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1994). Die aktivierende Punktmutationen des *RAS*-Onkogens ist häufig mit der Promotion kolorektaler Adenome verbunden (Fearon *et al.*, 1990; Vogelstein *et al.*, 1988). *RAS*-Proteine sind Teil des MAPK (Mitogen-aktivierten Proteinkinase)-Signalwegs (Fearon, 2011).

Der Großteil der *RAS*-Mutationen erfolgt zu 88 % im *KRAS*-Gen (Vogelstein *et al.*, 1988). In einer aktuellen Studie wurde der Mutationsstatus von kolorektalen Tumoren aus Patienten analysiert und zeigte, dass diese Tumore in ca. 43 % einen mutierten *KRAS*-Status aufwiesen (Jones *et al.*, 2017). Dabei waren ca. 80 % der *KRAS*-Mutationen im Codon 12 lokalisiert, was mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate in Verbindung gebracht wurde (Jones *et al.*, 2017). *KRAS* kodiert für ein Protein, welches durch Bindung an den EGF-Liganden ein *downstream*-Auslöser des EGF-Rezeptors ist. Dadurch werden mehrere nachgeschaltete zelluläre Proliferationswege, u.a. der PI3K- und RAF-vermittelte Signalweg, aktiviert (Fearon, 2011). *KRAS* aktiviert durch einen PI3K/Akt-abhängigen Signalweg in Darmkrebszellen den VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der als Wachstumsfaktor die molekulare Basis für die Angiogenese in gutartigen Kolonadenomen darstellt (Zhang *et al.*, 2001).

Weiterhin korrelieren kolorektale Karzinome mit aktivierenden Transitionsmutationen im Onkogen *RAF* insbesondere in *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), bei denen Thymin durch Adenin ersetzt wurde (T→A). Die Gene der *RAF*-Familie kodieren Kinasen, die durch *RAS* reguliert werden und zelluläre Antworten zu Wachstumssignalen vermitteln. *BRAF*-Mutationen treten nur in kolorektalen Tumoren auf, die keine Mutationen in *KRAS* tragen. Mutationen in einem dieser Gene sind häufiger in Adenomen, die größer als 1 cm sind, als in kleinen Adenomen zu finden (Rajagopalan *et al.*, 2002). Mutationen in *BRAF* oder *KRAS* kommen häufig nach der Initiationsphase vor, jedoch vor der malignen Umwandlung von kolorektalen Adenomen in Karzinome. Hier weisen vor allem Tumore mit MMR-Defekten eine Anhäufung von *BRAF*-Mutationen auf (Markowitz *et al.*, 2009; Rajagopalan *et al.*, 2002).

Neben den eigentlichen Mutationen können auch epigenetische Veränderungen, wie die Methylierung von CpG-Inseln, bei der KRK-Entstehung von Bedeutung sein. Diese repetitiven DNA-Sequenzen besitzen einen hohen CG-Gehalt und kommen häufig in eukaryotischen Genpromotoren vor. Bei der Hypermethylierung dieser Sequenzen werden meist Tumorsuppressorgene ausgeschaltet, woraus der Phänotyp des CIMP (CpG-Insel

Methylatorphänotyp) in kolorektalen Karzinomen resultiert. CIMP ist somit ein molekularer Defekt, der durch Hypermethylierung zustande kommt und mit KRK verknüpft ist (Toyota *et al.*, 1999). Die Methylierung dieser CpG-Inseln ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus zur Unterdrückung der Transkription bezüglich pathophysiologischer Prozesse in Neoplasien (Baylin *et al.*, 1998). Der CIMP kommt in vielen kolorektalen Adenomen und Karzinomen häufig im Tumorsuppressorgen *p16* und *hMLH1* vor (Toyota *et al.*, 1999). Daneben wird in kolorektalen Karzinomen meist eine Hypermethylierung der Promotorregion des DNA-Reparaturgens *MGMT* (*O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase*) beobachtet (siehe 1.2.2.2) (Herfarth *et al.*, 1999).

Bei einem Drittel der kolorektalen Tumore treten Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* auf dem Chromosom 17p auf (Shivapurkar *et al.*, 1997; Vogelstein *et al.*, 1988), die aus einer Aminosäuresubstitution im *p53*-Genprodukt resultiert. Gleichzeitig weisen diese Tumore einen allelischen Verlust des Chromosoms 17p auf, der bei der genetischen Rekombination somatischer Zellen während der Mitose erfolgen kann (Baker 1989, Vogelstein 1988). Die Mutationen im *p53*-Gen resultieren in einer Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion des wildtypischen *p53*-Proteins (Baker *et al.*, 1989). Über 75 % aller kolorektalen Karzinome zeigen einen Verlust des Chromosoms 17p auf, was zudem häufig mit der Progression kolorektaler Adenome in Karzinome korreliert, wohingegen wildtypisches *p53* das Tumorstwachstum hemmt (Baker *et al.*, 1990; Fearon *et al.*, 1990; Vogelstein *et al.*, 1988).

Bei der Entstehung von KRK spielen neben der Mutation von Tumorsuppressor- oder Onkogenen weitere Mechanismen eine wichtige Rolle. Das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), welches die Prostaglandinsynthese katalysiert, wurde als frühes Ereignis in der kolorektalen Tumorgenese charakterisiert (Yan *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass COX-2 durch Modulierung verschiedener Prozesse, wie Hemmung der Apoptose und Änderung der zellulären Adhäsion zur Tumorentstehung beiträgt und daher onkogene Funktionen aufweist. Eine Überexpression von COX-2 resultiert in einer gehemmten Apoptoserate, wodurch abnormale Darmepithelzellen überleben (Tsuji *et al.*, 1995). Der Beweis für eine Schlüsselrolle von COX-2 in der kolorektalen Tumorgenese lieferten *in vivo*-Studien mit *APC-knockout*-Mäusen nach pharmakologischer Hemmung von COX-2. Diese Hemmung resultierte in einer reduzierten Anzahl intestinaler Polypen (Oshima *et al.*, 1996). Der physiologische Antagonist zu COX-2 ist die 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH), die Prostaglandine abbaut. Die Expression von *15-PGDH* wird weiterhin durch *TGFβ* in einem tumorunterdrückenden Signalweg kontrolliert, wodurch 15-PGDH tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen werden (Yan *et al.*, 2004).

In kolorektalen Karzinomen wurden weitere aktivierende, somatische Mutationen z.B. in der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3KCA) entdeckt. Diese aktivierenden Mutationen steigern deren Kinaseaktivität und sind in der späten Tumorgenese involviert. Dadurch fungiert PI3KCA als Onkogen (Samuels et al., 2004). Der negative Regulator von PI3K ist die Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog), die als Tumorsuppressor durch Mutationen in KRK inaktiviert sein kann (Markowitz et al., 2009; Parsons et al., 2005). Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), über den meist der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert wird, zeigt im kolorektalen Tumorgewebe in Abhängigkeit des Tumorstadiums eine starke Überexpression. EGFR beeinflusst daher sowohl die Initiations- als auch die Progressionsphase (Spano et al., 2005).

#### 1.2.2.1 Molekulare Wege der kolorektalen Pathogenese und Klassifikationen

Genomische Instabilitäten weisen ein tumorpromovierendes Potenzial auf und sind entscheidend für die Klassifizierung kolorektaler Karzinome. In Anhängigkeit der geänderten molekularen Mechanismen wird bei Darmkrebs hauptsächlich zwischen Tumoren mit chromosomaler Instabilität (CIN) und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) unterschieden (Gupta et al., 2018; Markowitz et al., 2009). Mit ca. 85 % aller KRK-Fälle sind CIN-Tumore der häufigste Typ und resultieren aus Mutationen von Genen, die zu chromosomaler Aneuploidie, v.a. der Genloci 5q, 8p, 17p, 18q, zu dem Verlust der Heterozygotie und zu struktureller chromosomaler Umlagerung führen (Cunningham et al., 2010; Markowitz et al., 2009; Vogelstein et al., 1988). Dabei kommt es häufig zur Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, die die KRK Initiation und Progression begünstigen (Markowitz et al., 2009; Pino et al., 2010). Tumore mit CIN weisen zusätzlich Mutationen in *p53* auf (Lengauer et al., 1998).

Die MSI stellt mit 15 % den kleineren Teil der kolorektalen Tumore dar und ist eine Folge von erworbenen oder vererbten Mutationen in einem der vier DNA MMR-Gene (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*) (Gupta et al., 2018; Peltomäki, 2003). Die Proteine der MMR, v.a. MLH1 und MSH2, sind während der normalen Replikation für die Erkennung der fehlgepaarten DNA-Basen verantwortlich und unterstützen die Exzision dieser Schäden sowie die Bildung der korrigierten DNA-Basen. Im menschlichen Genom sind Mikrosatelliten besonders anfällig gegenüber dem Verlust der MMR-Aktivität (Boland et al., 2010). Dadurch kommt es zur Akkumulation von genetischen Fehlern an den Mikrosatelliten, die die Basis der MSI darstellen. Aufgrund der defekten MMR können weitere Mutationen entstehen, die zu einem Hypermutationsphänotyp führen (Boland et al., 2010). MSI entsteht sporadisch (12 %) durch epigenetische Veränderungen, bei denen

der MLH1-Promotor methyliert und folglich inaktiviert wird. Diese sporadisch auftretenden Veränderungen können mit dem CIMP verbunden sein. In 3 % der MSI-Tumore resultiert die Instabilität aus Keimbahnmutationen der MMR-Gene, wie es beim Lynch-Syndrom vorkommt (Boland *et al.*, 2010). Hier kommen die Keimbahnmutationen häufig in den Genen *MLH1* oder *MSH2* vor und können zudem einen mutierten KRAS-, aber niemals einen mutierten BRAF-Status aufweisen (Cunningham *et al.*, 2010; Markowitz *et al.*, 2009). Sowohl MSI als auch CIN werden zu den frühen Ereignissen der Tumorentstehung gezählt, obwohl die aus den Instabilitäten resultierenden genetischen Veränderungen die Tumorprogression vorantreiben (Lengauer *et al.*, 1998).

Zusätzlich können kolorektale Tumore auch über den serratierten Signalweg aus bereits vorhandenen serratierten, also gezähnten Vorläuferläsionen, wie Polypen oder Adenomen, entstehen. Hier scheint die Progression der unterschiedlichen molekularen Mechanismen durch die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz zu erfolgen (Cunningham *et al.*, 2010; Noffsinger, 2009).

In Tabelle 1 sind die oben beschriebenen drei unterschiedlichen molekularen Klassen kolorektaler Karzinome aufgeführt.

**Tabelle 1: Molekulare Klassifizierung kolorektaler Karzinome.**

Abkürzungen: CIMP=CpG-Insel methylierter Phänotyp; MSI=Mikrosatelliteninstabilität; MSS=Mikrosatellitenstabilität; MSI-H(igh)=hohes Level der MSI; MSI-L(ow)=niedriges Level der MSI, CIN=chromosomale Instabilität; KRAS=*Kirsten rat sarcoma*; BRAF=*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*; MLH1=MutL Homolog 1; MGMT=O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase; MMR=*mismatch repair*; +++=vorhanden; +/-=möglicherweise vorhanden; ---=abwesend. Modifiziert nach (Cunningham *et al.*, 2010; Noffsinger, 2009)

<b>Signalweg</b>	<b>CIN</b>	<b>MMR</b>	<b>serratierte Signalweg</b>	
	erblich und sporadisch	erblich	erblich	sporadisch
<b>CIMP Status</b>	negativ	negativ	hoch	
<b>MSI Status</b>	MSS	MSI-H	MSI-H	MSI-L
<b>CIN</b>	+++	---	---	---
<b>KRAS Mutationen</b>	+++	+/-	---	---
<b>BRAF Mutationen</b>	---	---	+++	+++
<b>MLH1 Status</b>	normal	mutiert	methyliert	teilweise methyliert
<b>MGMT Methylierung</b>	---	---	+/-	+++

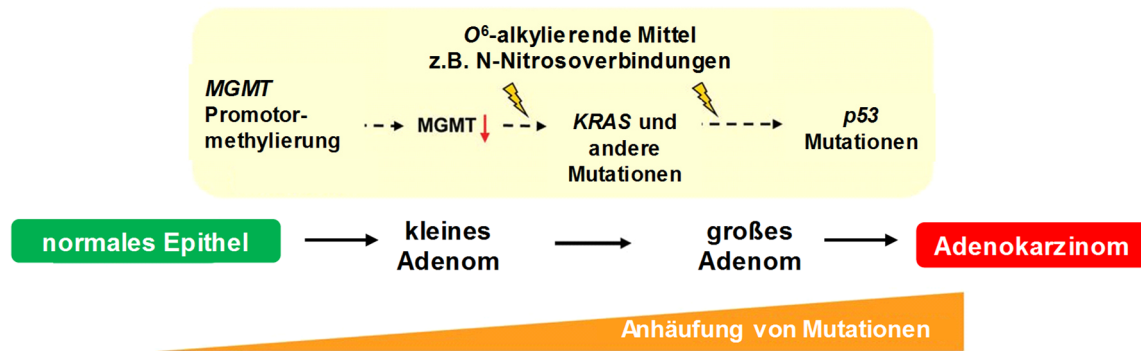
Für CED-assoziierte dysplastische Läsionen ist im Vergleich zu sporadischen Adenomen eine höhere CIN charakteristisch, was auf eine schnellere Progression dieser Dysplasien zu Tumoren hindeutet. Bei dieser Progression scheinen Mutationen in *FBXW7* (*f-box and WD repeat domain containing 7*) und *p53* eine wichtige Rolle zu spielen (Wanders *et al.*, 2019). FBXW7 ist ein bedeutender Tumorsuppressor und eines der am häufigsten deregulierten Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Es kontrolliert den Proteasom-vermittelten Abbau von Onkogenen wie z.B. *Cyclin E*, *c-Myc* und *mTOR* (Yeh *et al.*, 2018).

### 1.2.2.2 Die Beteiligung von MGMT an der Dickdarmkrebsentstehung

In der Entstehung von Dickdarmkrebs übernimmt das DNA-Reparaturenzym MGMT eine entscheidende Rolle. Ein Promotor reguliert die Genexpression dieses Enzyms, und wird dieser durch Methylierung inaktiviert, kann keine MGMT-Expression mehr erfolgen (Esteller *et al.*, 2001b). Methylierungsanalysen von Gewebe kolorektaler Karzinome weisen eine vermehrte Methylierung von CpG-Stellen des MGMT-Promotors mit einer stark reduzierten MGMT-Expression auf (Herfarth *et al.*, 1999).

Kritische Alkylierungsläsionen der DNA für KRK sind v.a.  $O^6$ -Methylguanin- ( $O^6$ -MeG) und  $O^6$ -Carboxy-Methylguanin-Addukte ( $O^6$ -CMG), die durch *N*-Nitrosoverbindungen (*N-nitroso compounds*, NOCs) und im Fall von  $O^6$ -CMG durch die Nitrosierung von Glycinderivaten im gastrointestinalen Trakt unter physiologischen Bedingungen entstehen (siehe 1.4.2) (Cupid *et al.*, 2004).

Sowohl unreparierte  $O^6$ -MeG- als auch  $O^6$ -CMG-Läsion gehen während der Replikation Basenfehlpaarungen mit Thymin ein, wodurch Transitionsmutationen von G:C zu A:T erfolgen (Esteller *et al.*, 2001b; Lind *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang wurden Promotorhypermethylierungen von MGMT und die dadurch bedingte Inaktivierung des Proteins häufig mit Transitionsmutationen im Tumorsuppressorgen *p53* (Esteller *et al.*, 2001b; Lind *et al.*, 2004) und im Protoonkogen *KRAS* beobachtet (Esteller *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2004; Whitehall *et al.*, 2001). Kolorektale Tumore mit einem methylierten MGMT-Status weisen in 34 % der Fälle Transitionsmutationen in *p53* auf (Esteller *et al.*, 2001b). Eine starke Korrelation zwischen MGMT-Promotormethylierung und *KRAS*-Mutationen wurde in sporadischem KRK mit einer geringen MSI beobachtet (Tabelle 1) (Whitehall *et al.*, 2001). Solche Promotormethylierungen von MGMT werden bereits auf Ebene der ACF beobachtet und treten meist in ACF sporadischer kolorektaler Karzinome auf (Chan *et al.*, 2002). Die Methylierung des MGMT-Promotors stellt ein frühes Ereignis der kolorektalen Kanzerogenese dar, wodurch die genomische Instabilität und die Mutationsrate (*p53*, *KRAS*) aufgrund der fehlenden Reparaturkapazität deutlich erhöht und so die maligne Progression von Tumoren vorangetrieben wird (Esteller *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2001b; Fahrer *et al.*, 2013; Vogelstein *et al.*, 1993). In Abb. 4 ist der Zusammenhang von MGMT in der kolorektalen Kanzerogenese schematisch dargestellt.



**Abbildung 4: Die Rolle von MGMT in der kolorektalen Kanzerogenese.**

Liegt eine MGMT-Inaktivierung des Promotors vor, resultieren aufgrund der fehlenden Reparaturkapazität weitere DNA-Methylierungen, die mit einer epigenetischen Inaktivierung der MMR- korrelieren. Die epigenetische Inaktivierung von MGMT prädisponiert das kolorektale Gewebe gegenüber O<sup>6</sup>-alkylierender Agenzien, z.B. aus der Nahrung. Hierzu zählen die endogen gebildeten NOC, die O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG induzieren, und aufgrund der fehlenden Reparaturkapazität in Mutationen resultieren. MGMT Hypermethylierungen werden mit G:C zu A:T Transitionsmutationen im *KRAS*-Onkogen und in der Mutagenese von *p53* in Verbindung gesetzt. Es liegt nahe, dass die Inaktivierung von MGMT einen Einfluss auf die Tumorentstehung und Progression hat. Modifiziert nach (Fahrer *et al.*, 2013).

Untersuchungen von humanen kolorektalen Tumoren ergaben, dass 40-50 % eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors aufweisen (Esteller *et al.*, 2001b; Fahrer *et al.*, 2013; Lind *et al.*, 2004). Von diesen 40-50% der Hypermethylierungen des MGMT-Promotors wurden 36 % in sporadischem KRK nachgewiesen (Esteller *et al.*, 2001a).

Die Beteiligung von MGMT in der Alkylantien-induzierten Kanzerogenese wurde durch *in-vivo*-Studien bestätigt. Mithilfe von MGMT-defizienten Mäusen (MGMT<sup>-/-</sup>) konnte eine signifikant gesteigerte Empfindlichkeit dieser Tiere gegenüber einer Behandlung mit dem alkylierenden Methylnitrosoharnstoff im Vergleich zu Tieren mit homozygot-wildtypischem oder heterozygotem MGMT-Status beobachtet werden (Sakumi *et al.*, 1997). In Bezug auf die Dickdarmkrebsentstehung bilden MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse nach einer Behandlung mit dem alkylierenden Mittel Azoxymethan (AOM) vermehrt kolonständige ACF aus. In Kombination mit einer DSS (*Dextran sodium sulfat*)-induzierten Koloninflammation entwickeln diese Reparatur-defizienten Mäuse verstärkt kolorektale Adenome (Bugni *et al.*, 2009). AOM ist eine kolonotrope Substanz, die üblicherweise als DNA-Schadensinitiator in der KRK-Induktion in Nagern verwendet wird (Wirtz *et al.*, 2010). Transgene Mäuse mit überexprimiertem MGMT zeigen im Gegensatz dazu eine deutliche Reduktion der AOM-induzierten ACF sowie der *KRAS*-Mutationen in der Kolonmukosa im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (Zaidi *et al.*, 1995). Aktuelle Studien bestätigen eine erhöhte Rate kolorektaler Tumore in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach einmaliger AOM-Injektion mit zwei darauffolgenden DSS-Zyklen (Dörsam *et al.*, 2018; Wirtz *et al.*, 2010). Zusätzlich induziert eine pharmakologische Hemmung von MGMT mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-BG) in AOM-

behandelten Ratten eine signifikant erhöhte Anzahl kolorektaler Tumore in Verbindung mit vermehrten Auftreten von *KRAS*-Mutationen im Kolon (Wali *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren wurde mithilfe des AOM-DSS-Modells an MGMT-defekten Mäusen eine lineare Dosiswirkung in der kolorektalen Tumorentstehung ohne das Vorhandensein eines Schwellenwertes demonstriert, was im Gegensatz zu wildtypischen Tieren stand (Fahrer *et al.*, 2015). Diese und weitere Studien verdeutlichen die schützende Funktion von MGMT in der Ätiologie von Darmkrebs bei einem bereits geringen Alkylierungsschaden (Dörsam *et al.*, 2018; Fahrer *et al.*, 2015).

### 1.3 Ernährung und Darmkrebs

Die Ernährung spielt eine wichtige Rolle in der Darmkrebsentstehung. Schätzungsweise sind mehr als 30 % aller Darmkrebserkrankungen auf die Ernährung zurückzuführen (Parkin *et al.*, 2011). Hierbei ist v.a. der Verzehr von rotem und prozessiertem Fleisch, sowie eine ballaststoffarme Diät mit einem erhöhten Dickdarmkrebsrisiko verbunden (Bingham *et al.*, 2002; Norat *et al.*, 2005; Parkin *et al.*, 2011). Ein weiterer Risikofaktor in der kolorektalen Kanzerogenese stellt der Verzehr von alkoholischen Getränken dar (Parkin *et al.*, 2011).

Die internationale Agentur für Krebsforschung (*international Agency for Research on Cancer*, IARC) hat 2015 verarbeitetes Fleisch als für den Menschen kanzerogen (Gruppe 1 kanzerogen) und rotes Fleisch als wahrscheinlich krebserregend (Gruppe 2 A kanzerogen) eingestuft (Bouvard *et al.*, 2015). Als rotes Fleisch wird unverarbeitetes Muskelfleisch aus z.B. Rind, Wild oder Lamm bezeichnet, welches sich durch einen hohen Myoglobingehalt auszeichnet. Im Gegensatz dazu kann prozessiertes Fleisch sowohl rotes als auch als weißes Fleisch darstellen. Dieses wird durch Pökeln, Räuchern, Kochen oder Braten behandelt, um den Geschmack und die Haltbarkeit zu verbessern. Durch das Verarbeiten und Erhitzen von Fleisch bei hohen Temperaturen steigt die Menge der Lebensmittelkarzinogene deutlich an (Sugimura, 2000).

Zu diesen Lebensmittelkanzerogenen gehören die heterozyklischen aromatischen Amine (HAAs), die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe und die NOCs, die nach metabolischer Aktivierung DNA-schädigende Eigenschaften aufweisen (Fahrer *et al.*, 2017; Santarelli *et al.*, 2008). In der Dickdarmkrebsentstehung sind HAAs und NOCs von besonderer Bedeutung (Fahrer *et al.*, 2017; Santarelli *et al.*, 2008).

HAAs entstehen beim Kochen bei hohen Temperaturen. Deren wichtigste Vertreter gehören zu den Aminoimidazoarenen 2-Amino-3-Methyl-Imidazo[4,5-f]Quinoline (IQ), 2-Amino-3-Methyl-Imidazo [4,5-f]Quinoxaline (IQx) und 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo [4,5-b]Pyridine (PhIP) und entstehen bei Temperaturen von 150-250 °C (Jägerstad *et al.*,



1991). Alle heterozyklischen Amine weisen nach metabolischer Aktivierung DNA-schädigende Eigenschaften auf. Dazu werden die Amine zunächst während des Phase-I-Metabolismus durch das Enzym Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) an der exozyklischen Aminogruppe *N*-hydroxyliert und in der Phase-II verestert, woraus eine Sulfat- oder Acetatgruppe resultiert. Das entstandene Arylnitrenium- bzw. das Arylcarbeniumion bindet bevorzugt an Guanin der DNA und bildet dadurch unterschiedliche sperrige DNA-Addukte (Fahrer *et al.*, 2017).

Als Resultat der exogen aber auch endogen gebildeten NOCs können alkylierte DNA-Basen entstehen. In der Dickdarmkrebsentstehung sind v.a.  $O^6$ -MeG und  $O^6$ -CMG von essentieller Bedeutung (Fahrer *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2017) (1.2.2). Auf deren Bildung wird in Kapitel 1.4.2.1.1 genauer eingegangen.

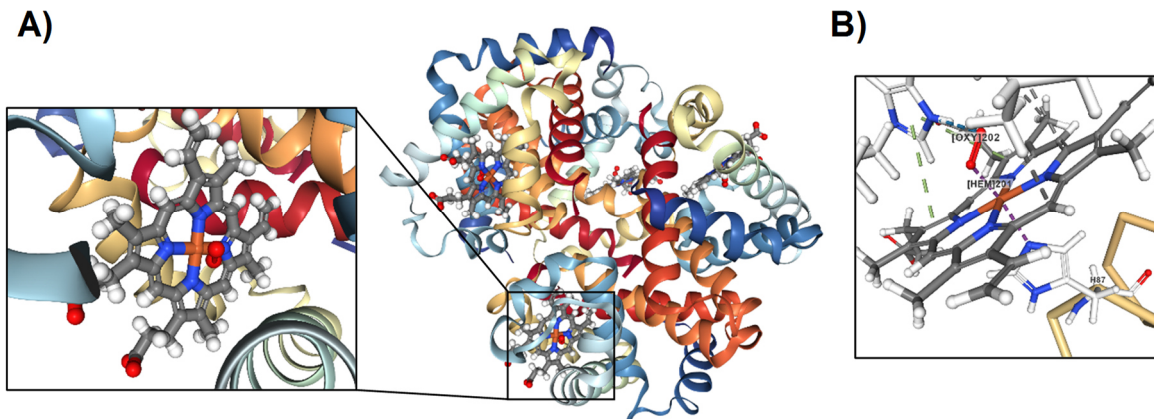
Zusätzlich besitzt rotes Fleisch hohe Mengen an Häm-Eisen, welches möglicherweise durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und NOCs im Kolon genotoxisch wirken kann und so einen potenziellen Risikofaktor für die Dickdarmkrebsentstehung darstellt (1.4) (Bouvard *et al.*, 2015; Santarelli *et al.*, 2008).

### 1.4 Struktur und Funktion von Häm

Häm ist die prosthetische Gruppe von Häm-Proteinen, die essentiell für biologische Prozesse wie Transport und Speicherung von diatomaren Gasen ( $O_2$ , CO, NO), den Elektronentransfer und die Modulation der Genexpression sind. Die hydrophobe Metalloverbindung Häm besitzt ein zentrales  $Fe^{2+}$ -Atom, welches über Stickstoffatome im Porphyrinring koordinativ gebunden ist. Häm kommt als Variante *a*, *b* und *c* vor, wobei Häm *b* die häufigste Variante bei Säugern ist und in Hämoglobin und Myoglobin auftritt. Häm *a* und *c* sind meist in Cytochrom *c* und Cytochrom *c*-Oxidasen als Elektronentransfermoleküle zu finden (Larsen *et al.*, 2012; Reedy *et al.*, 2004). Hämoglobin besteht aus vier Globin-Untereinheiten, davon zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten, von der jede eine Polypeptidkette und eine Häm-Gruppe besitzt und somit vier Sauerstoffmoleküle nicht-kovalent binden kann. Das zweiwertige Eisen ( $Fe^{2+}$ ) im Hämoglobin bzw. Myoglobin bindet mit den beiden freien Koordinationsstellen an Sauerstoff ( $O_2$ ) und den Imidazolring des Histidinrestes im Globin. Der Sauerstoff wird reversibel an  $Fe^{2+}$  in jeder Häm-Gruppe gebunden, wodurch das Eisen oxidiert wird ( $Fe^{3+}$ ). Bei der Bindung mit Sauerstoff kommt es zu einer Konformationsänderung. Die Lage des Häm-Moleküls im Globin und die Bindung von Sauerstoff an Häm-Eisen ist in Abb. 5 dargestellt. Je eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette bilden zwei Heterodimere, die über Salzbrücken miteinander verbunden sind (Eckert *et al.*, 2002; Marengo-Rowe, 2006). Das monomere Myoglobin ist das  $O_2$ -Speicherprotein der



Muskelzellen und zeigt deutliche Homologien zur  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins. Myoglobin nimmt Sauerstoff aus dem Blut auf und verteilt ihn in den Muskelzellen, die diesen für die Zellatmung benötigen (Eckert *et al.*, 2002).



**Abbildung 5: Röntgenstrukturanalyse von humanem Oxyhämoglobin.**

A) Oxyhämoglobin mit vier prothetischen Protoporphyrin IX-Einheiten mit jeweils einem zentralen Eisen-Ion (Häm b  $C_{34}H_{32}FeN_4O_4$ ), welches an Sauerstoff gebunden ist. B) Bindung von Sauerstoff an Häm-Eisen mit der Koordination zu einem Histidinrest im Globin. Darstellung der RDB ID 6BB5 mit dem NGL Viewer nach (Terrell *et al.*, 2018).

#### 1.4.1 Vorkommen und gastrointestinale Resorption von (Häm-) Eisen

Eisen ist ein essentieller Mikronährstoff, welcher über die Nahrung aufgenommen werden muss. Diätisches Eisen kommt als Nicht-Häm-Eisen bzw. anorganisches Eisen in Gemüse, Cerealien und Milcherzeugnissen vor, wohingegen Häm-Eisen hauptsächlich aus tierischem Muskelfleisch stammt (Martinez-Torres *et al.*, 1971; Valenzuela *et al.*, 2009). Hier ist es v.a. in Myoglobin, aber auch in geringeren Anteilen in Hämoglobin und Cytochromen reversibel gebunden (Bechaux *et al.*, 2018). Häm-Eisen besitzt eine höhere Bioverfügbarkeit als anorganisches Eisen, wobei die des anorganischen Eisens sehr von anderen Lebensmittelinhaltsstoffen oder Zusätzen wie beispielsweise der Ascorbinsäure beeinflusst wird (Hallberg *et al.*, 1989; Monsen *et al.*, 1978; Valenzuela *et al.*, 2009). Ascorbinsäure reduziert dabei das dreiwertige anorganische Eisen, welches in seiner Ursprungsform zunächst unlöslich und damit nicht bioverfügbar ist, in zweiwertiges Eisen und kann so anschließend aufgenommen werden (Hallberg *et al.*, 1989; Han, 2011). Obwohl Häm-Eisen nur ca. 10 % der täglich über die Nahrung aufgenommenen Gesamteisenmenge ausmacht, ist es für ca. 66 % des absorbierten Eisens verantwortlich (Han, 2011).

Rotes Fleisch unterscheidet sich durch seinen hohen Myoglobingehalt von weißem Fleisch (z.B. Hühnchen) und besitzt ca. die 10-fache Menge an Häm-Eisen verglichen mit weißem

Fleisch (Lombardi-Boccia *et al.*, 2002). Interessanterweise korreliert der Verzehr von rotem Fleisch, aber nicht der von weißem Fleisch, mit einem signifikant erhöhten Darmkrebsrisiko (Bastide *et al.*, 2011; Lombardi-Boccia *et al.*, 2002). Tabelle 2 stellt eine Übersicht der Gesamteisenmenge und deren prozentuale Unterteilung in Häm-Eisen und Nicht-Häm-Eisen in unterschiedlichen Fleischsorten in rohem und gekochtem Zustand dar.

**Tabelle 2: Übersicht der Häm-Eisen-Mengen in Fleisch in mg/100 g (Frischgewicht).**

Modifiziert nach (Lombardi-Boccia *et al.*, 2002)

Fleischprodukt <b>roh</b>	Gesamteisen	Häm-Eisen	Nicht-Häm-Eisen	% Häm-Eisen von Gesamteisen
Hühnchen Ø	0,59 ± 0,1	0,22 ± 0,1	0,37 ± 0,2	38
Truthahn Ø	0,79 ± 0,2	0,35 ± 0,1	0,44 ± 0,1	42
Rindfleisch Ø	2,09 ± 0,2	1,82 ± 0,2	0,28 ± 0,4	87
Lammkotlett	2,23 ± 0,3	1,68 ± 0,4	0,55 ± 0,8	75
Straußenfilet	2,43 ± 0,2	1,76 ± 0,1	0,67 ± 0,3	72
Schwein Ø	0,42 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,17 ± 0,2	62
Fleischprodukt <b>gekocht</b>	Gesamteisen	Häm-Eisen	Nicht-Häm-Eisen	% Häm-Eisen von Gesamteisen
Hühnchen Ø	1,01 ± 0,3	0,28 ± 0,1	0,73 ± 0,3	28
Truthahn Ø	1,25 ± 0,4	0,45 ± 0,2	0,80 ± 0,2	35
Rindfleisch Ø	3,39 ± 0,4	2,63 ± 0,5	0,77 ± 0,2	78
Lammkotlett	3,20 ± 0,3	2,25 ± 0,2	0,95 ± 0,5	70
Straußenfilet	3,78 ± 0,5	2,85 ± 0,2	0,93 ± 0,7	75
Schwein Ø	0,64 ± 0,2	0,39 ± 0,2	0,24 ± 0,1	61

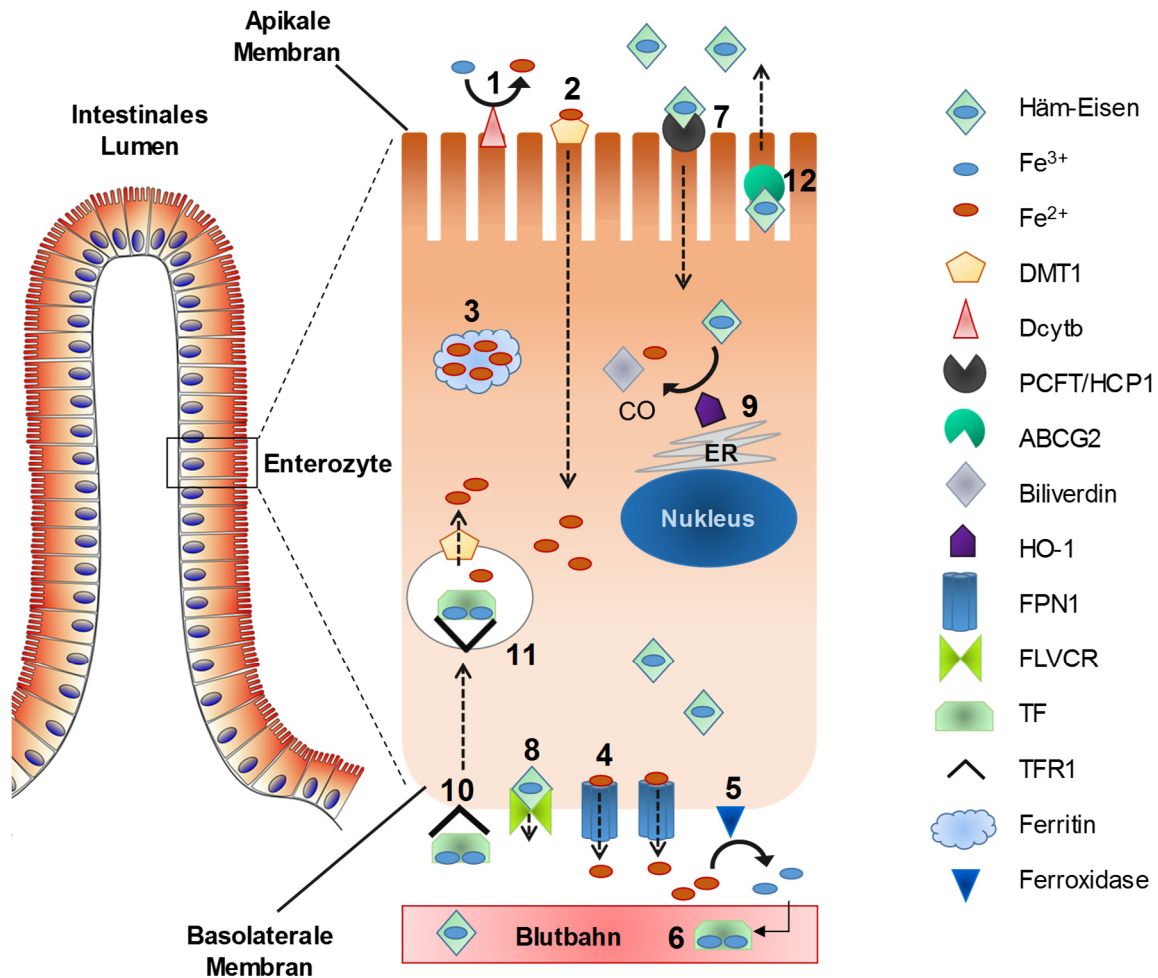
In Abhängigkeit der verwendeten Zubereitungsart des Fleisches wird die Häm-Eisenkonzentration durch diese thermischen Prozesse verändert und das Häm-Eisen in unterschiedlichem Ausmaß freigesetzt (Lombardi-Boccia *et al.*, 2002). Diese Veränderungen werden größtenteils auf den Feuchtigkeitsverlust beim Erhitzen zurückgeführt (Lombardi-Boccia *et al.*, 2002). Das Erhitzen bedingt zunächst einen Anstieg an unlöslichem Häm-Eisen, welches sich im Laufe dieses Prozesses schließlich in unlösliches Nicht-Häm-Eisen umwandelt (Purchas *et al.*, 2003). Das lösliche Häm-Eisen kann beim Kochen aus dem denaturierten Myoglobin abgespalten und in unlösliches Häm-Eisen umgewandelt werden. Gleichzeitig kann das Eisen aus dem Häm-Eisenring freigegeben werden (Purchas *et al.*, 2003).

Während des Kochens wird das Häm-Eisen aus dem Myoglobin als Hämatin, also Häm mit einer Hydroxylgruppe als Koordinationsion freigesetzt (Bechaux *et al.*, 2018). Aufgrund der hohen Salzsäurekonzentration im Magen wird Häm-Eisen dort in Hämin, also mit einem Chloridion als Koordinationsion umgewandelt (Bechaux *et al.*, 2018; Richards, 2013). Des Weiteren kann beim Reifungsprozess von Fleisch das darin enthaltene Wasserstoffperoxid durch oxidative Spaltung das Eisen aus Häm des Porphyrinrings lösen (Bechaux *et al.*,

2018). Nach peroraler Aufnahme über die Nahrung wird die Freisetzung von Häm-Eisen aus Myoglobin und Hämoglobin im sauren Magenmilieu begünstigt. Neben dieser chemischen Denaturierung können auch weitere Faktoren hierbei eine Rolle spielen. Die Proteolyse des Globins, die im Magen aber v.a. im Dünndarm abläuft, setzt zunehmend das Häm-Eisen aus Myoglobin in unlösliches Hämatin um, welches an Fragmente des teilweise hydrolysierten Myoglobins gebunden ist und damit die lösliche Form darstellt (Bechaux *et al.*, 2018; Hooda *et al.*, 2014; West *et al.*, 2008). Durch Neutralisierung des Mageninhaltes mit Pankreassaft kommt es zur Bildung von unlöslichen Häm-Polymeren mit einer deutlich reduzierten Bioverfügbarkeit. Diese Polymerisierung von Häm kann durch Interaktionen von Häm mit Peptiden, z.B. aus dem proteolytischen Verdau von Globin, verhindert werden (Conrad *et al.*, 2000; Hooda *et al.*, 2014; West *et al.*, 2008). Eine Kombination aus Protein- und Häm-Eisen-reicher Diät steigert die Bioverfügbarkeit von Häm-Eisen signifikant (Han, 2011; West *et al.*, 2008).

Während ältere Studien auf eine geringe Häm-Eisenabsorption im Dünndarm (ca. 10 %) hindeuten (Young *et al.*, 1989), legen aktuellere Studien nahe, dass die Eisenabsorption aus Nahrungsmitteln hauptsächlich im proximalen Dünndarm (v.a. Duodenum) stattfindet, aber auch mit einer geringeren Effizienz im distalen Dünndarm oder Kolon erfolgen kann (Geissler *et al.*, 2011; Gulec *et al.*, 2014). Erhöhte Aufnahmeraten von Häm-Eisen wurden nach zweiwöchiger Fütterung im Kolon dokumentiert (Sesink *et al.*, 1999).

Die intestinale Aufnahme von Häm- und Nicht-Häm-Eisen ist in Abb. 6 dargestellt. Bevor anorganisches Eisen bzw. Eisenkomplexe aufgenommen werden können, muss das darin gebundene dreiwertige Eisen reduziert werden (Han, 2011). Dieser Prozess kann einerseits über diätische Faktoren, wie die Aufnahme von eisenreduzierender Ascorbinsäure und andererseits durch die Ferrireduktase Dcytb (duodenales Cytochrom B), die an der apikalen Enterozytenmembran lokalisiert ist, katalysiert werden (Abb. 6). Anschließend erfolgt der aktive Transport des reduzierten Eisens ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in die Zelle unter der Beteiligung des divalenten Metalltransporters 1 (DMT1) (Conrad *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2000; Hallberg *et al.*, 1989). Innerhalb der Enterozyten wird Eisen entweder in dem Eisenspeicherprotein Ferritin gelagert oder aus der Zelle exportiert und letztendlich in die Blutbahn abgegeben. Zur intrazellulären Speicherung bindet Eisen an Ferritin, welches bis zu 4500 Eisen-Ionen aufnehmen und speichern kann (Harrison *et al.*, 1996).



**Abbildung 6: Intestinale Aufnahme von anorganischem vs. Häm-Eisen in Enterozyten.**

Anorganisches Eisen wird von der Ferrireduktase Dcytb (1) in zweiwertiges Eisen reduziert und im Anschluss aktiv über DMT1 (2) in die Enterozyten transportiert. Das internalisierte Eisen kann in Ferritin (3) gespeichert oder weiter durch die basolaterale Membran über Ferroportin 1 (FPN1, 4) exportiert werden. Hier wird  $\text{Fe}^{2+}$  durch Ferroxidasen (5) oxidiert und bindet in Paaren ( $2 \times \text{Fe}^{3+}$ ) an Transferrin (TF, 6), welches das Eisen über die Blutbahn zu den Zielzellen transportiert. Diferrisches TF bindet an seinen Rezeptor (TFR1, 10). Dieser Komplex wird über clathrinbeschichtete Vesikel internalisiert, der schließlich mit Endosomen (11) fusioniert und das Eisen durch den sauren pH oxidiert.  $\text{Fe}^{2+}$  wird über DMT1 ins Zytoplasma transportiert. Häm-Eisen wird aktiv über PCFT/HCP1 (7) in die Zelle transportiert, in der es von der am ER lokalisierten Hämoxygenase 1 (HO-1, 9), zu  $\text{Fe}^{2+}$ , CO und Biliverdin abgebaut wird. Überschüssiges Häm-Eisen kann durch die apikale Membran über den ABC-Transporter ABCG2 (12) aus den Enterozyten transportiert werden.

Zur extrazellulären Verteilung wird  $\text{Fe}^{2+}$  durch die basolaterale Membran über den Transporter bzw. die Eisen-Effluxpumpe Ferroportin (FPN1, slc46a1) in die Blutbahn abgegeben (Rouault, 2005; Torti *et al.*, 2013). Die dort beteiligten Ferroxidasen, wie Ceruloplasmin oder Hephaestin, oxidieren  $\text{Fe}^{2+}$  wieder zu  $\text{Fe}^{3+}$ , bevor es auf das Eisentransferglykoprotein Transferrin (TF) übertragen wird (Torti *et al.*, 2013). TF bindet bis zu zwei Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ )-Ionen und transportiert diese zu den Zielzellen. An der Oberfläche der Zielzellen bindet diferrisches TF an den TF-Rezeptor 1 (TFR1). Anschließend wird der

TF/TFR1-Komplex über clathrinbeschichtete Vesikel internalisiert, die dann mit Endosomen fusionieren.  $\text{Fe}^{3+}$  wird durch die saure Umgebung der Endosomen vom Komplex freigesetzt und durch Reduktasen zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. DMT1 exportiert  $\text{Fe}^{2+}$  aus den Endosomen ins Zytoplasma, wo es an Ferritin binden kann (Crichton *et al.*, 2002; Gruenheid *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 1999). Zielzellen des Eisentransports sind z.B. eisenproduzierende Enzyme und Proteine, wie Cytochrome, Hämoglobin bzw. Myoglobin, Eisen-Schwefel-Proteine und Ribonukleotid-Reduktasen (Kaim *et al.*, 2005; Torti *et al.*, 2013). Der TF-TFR1-Signalweg repräsentiert den Hauptsignalweg der Eisenaufnahme in bestimmte Zelltypen wie den erythroiden Zellen, die auf Eisen angewiesen sind. Das Eisen kann zudem direkt zur Erythropoese zu den Knochenmarkserythroblasten transportiert werden (Levy *et al.*, 1999).

Für die intestinale Aufnahme von Häm-Eisen sind aus der Literatur zwei mögliche Wege bekannt. Der erste involviert die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei wird angenommen, dass Häm an einen Rezeptor bindet, der an der apikalen Membran der Enterozyten lokalisiert ist (Grasbeck *et al.*, 1979). Häm wird absorbiert und gelangt als intaktes Metalloprotein über Vesikel ins Lumen der Enterozyten. Das internalisierte Häm kann dann direkt wieder durch die basolaterale Membran über den Häm-Exporter FLVCR1 (*feline leukemia virus subgroup C* Rezeptor 1) exportiert werden. Im Blut bindet Häm an das zirkulierende Glykoprotein Hemopexin. Des Weiteren ist der ABC-Transporter ABCG2 am Häm-Export beteiligt. Er ist an der apikalen Membran der Enterozyten lokalisiert und schleust überschüssiges Häm aus den Enterozyten, um diese vor dessen toxischen Effekten zu schützen (Latunde-Dada *et al.*, 2006). Die Häm-Eisen-vermittelte Induktion von ABCG2 wurde durch Transkriptomanalysen bestätigt, bei denen die Kolonmukosa von Mäusen nach der Häm-Eisendiät eine verstärkte Expression des ABCG2-Gens aufwies (Ijssennagger *et al.*, 2012b).

Der zweite Weg der Häm-Eisenaufnahme läuft über den Häm-spezifischen Transporter PCFT/HCP1 (Protonen-gekoppelter Folat Transporter/*heme carrier protein 1*) ab. PCFT/HCP1 ist apikal am Bürstensaum der Enterozyten lokalisiert und transportiert Häm-Eisen in einer temperaturabhängigen Weise in die Zellen. Zusätzlich spielt PCFT/HCP1 eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Folathomöostase (Latunde-Dada *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2006; Shayeghi *et al.*, 2005). HCP1 ist entscheidend für die intestinale Häm-Aufnahme, dessen Expression von der Eisen- und Häm-Verfügbarkeit im Organismus kontrolliert wird (Hooda *et al.*, 2014). Auch bei diesem Aufnahmeweg liegt Häm-Eisen intrazellulär als intaktes Metalloporphyrin vor (Shayeghi *et al.*, 2005).

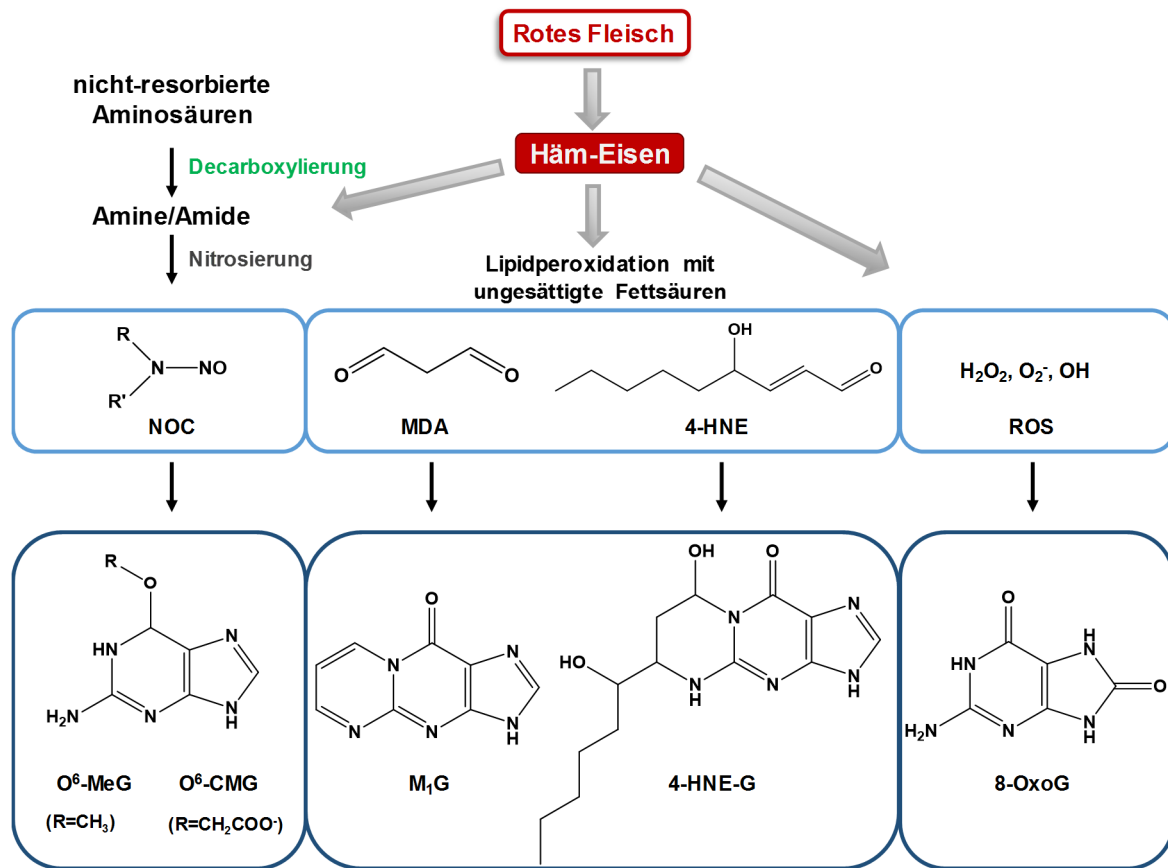
Intrazellulär wird Häm durch die Hämoxygenase 1 (HO-1) reduziert und degradiert. HO-1 wird an der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) exprimiert und zeigt mit seinem katalytisch aktiven Zentrum in Richtung des Zytosols (Gottlieb *et al.*, 2012). Der genaue Mechanismus, wie das Häm durch das Zytosol zur ER-gebundenen HO-1 transportiert wird, ist noch nicht bekannt (Gottlieb *et al.*, 2012). Genexpressions- und Proteinanalysen von Mäusen, die mit Häm-Eisen gefüttert wurden, zeigten eine Häm-vermittelte Induktion der HO-1 (Ijssennagger *et al.*, 2012b). Der Abbau von Häm über HO-1 resultiert in der Bildung von  $\text{Fe}^{2+}$ , Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin, welches durch die Biliverdin-Reduktase katalysiert zu Bilirubin abgebaut wird (Crichton *et al.*, 2002; Raffin *et al.*, 1974; Xue *et al.*, 2013). Das resultierende  $\text{Fe}^{2+}$  kann analog zum anorganischen Eisen gespeichert oder durch die basolaterale Membran über FPN1 exportiert werden. Durch Genexpressionsanalysen der Kolonmukosa Häm-Eisen-gefütterter Mäuse wurde eine Abhängigkeit der Expression von *FPN1* von Häm-Eisen beobachtet. Nach Häm-Eisendiät wurde eine Herabregulation von *FPN1/slc46a1* an der apikalen Membran der Enterozyten beobachtet, was als Schutzmechanismus vor Häm-induzierter Toxizität durch die folgende reduzierte Häm-Aufnahme interpretiert wurde (Ijssennagger *et al.*, 2012b; West *et al.*, 2008).

Der Eisenexport wird zusätzlich von Hepcidin, einem negativen Regulatorhormon, kontrolliert. Hepcidin bindet an FPN1, wodurch es intrazellulär aufgenommen und anschließend abgebaut wird, was zu einer Reduktion der Eisenexportkapazität führt (Knutson, 2010; Nemeth *et al.*, 2004). Zudem wird Hepcidin durch das Plasma-Eisentransportprotein TF reguliert (Bartnikas *et al.*, 2011).

### 1.4.2 Potenzielle Mechanismen der Häm-Eisen-vermittelten KRK-Entstehung

Wie oben bereits erwähnt, stuft die IARC den Verzehr von rotem Fleisch als wahrscheinlich krebserregend und den von verarbeitetem Fleisch als krebserregend für den Menschen ein (Bouvard *et al.*, 2015). Zudem korreliert der Verzehr von rotem und prozessiertem Fleisch mit einem erhöhtem Darmkrebsrisiko (Stewart *et al.*, 2014).

Abb. 7 zeigt die potenzielle durch Häm-Eisen-vermittelte Bildung DNA-reaktiver Verbindungen und die daraus resultierenden DNA-Schäden, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.



**Abbildung 7: Häm-Eisen-induzierte potenzielle DNA-Schäden.**

Aminosäuren, die im Dünndarm nicht resorbiert wurden, werden durch Bakterien decarboxyliert und zu Aminen/Amiden umgewandelt. In diesem Umwandlungsschritt könnte Häm-Eisen eine Rolle spielen. Anschließend erfolgt eine N-Nitrosierung der Amine/Amide zu NOCs. Nach metabolischer Aktivierung resultieren u.a. O<sup>6</sup>-MeG- und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen. Häm-Eisen begünstigt zusammen mit ungesättigten Fettsäuren die Lipidperoxidation, bei der u.a. Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) entstehen. Beide binden bevorzugt an Guanin und bilden M<sub>1</sub>G- bzw. 4-HNE-G-Addukte. Weiterhin katalysiert Häm-Eisen über die Fenton Reaktion die Bildung von ROS, die zu 8-OxoG-Läsionen führen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Häm-assoziierten Dickdarmkrebsentstehung sind noch nicht komplett entschlüsselt. Es wird vermutet, dass folgende Mechanismen wahrscheinlich eine Rolle spielen. Einerseits katalysiert Häm-Eisen über einen noch unbekannten Mechanismus die Bildung endogener NOCs, die mutagene DNA-Läsionen wie O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG induzieren (Bastide *et al.*, 2011). Des Weiteren fördert es über die Fenton-Reaktion die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die für Lipidperoxidationen (LPO) verantwortlich sind und wiederum zytotoxische und genotoxische Verbindungen generieren. ROS können zudem oxidative DNA-Schäden wie beispielsweise 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) induzieren (Bastide *et al.*, 2011; Termini, 2000; Torti *et al.*, 2013).



#### 1.4.2.1 Bildung genotoxischer Substanzen durch Häm-Eisen

Die potenzielle Häm-Eisen-vermittelte Genotoxizität wurde in *in vivo*-Studien mit Ratten nach aufsteigenden Mengen an rotem Fleisch in Form von gekochtem Rindfleisch untersucht. Hier wurden mithilfe des alkalischen *Comet*-Assays eine dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in isolierten Kolonozyten nachgewiesen (Toden *et al.*, 2007). Damit übereinstimmend induziert eine Hämoglobindiät in Mäusen einen Anstieg der Phosphorylierung des Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX), einem Doppelstrangbruchmarker, in der Kolonmukosa (Bastide *et al.*, 2015). Diese beobachtete Induktion der DNA-Strangbrüche könnte entweder direkt durch Häm, oder indirekt über Häm-induzierte Zwischenprodukte (ROS, NOCs) und den daraus resultierenden oxidativen bzw. alkylierenden DNA-Läsionen induziert werden.

##### 1.4.2.1.1 Häm-Eisen-vermittelte Bildung endogener NOCs und alkylierter DNA-Schäden

Der genaue zugrundeliegende Mechanismus der Häm-vermittelten Bildung der NOCs ist bisher unklar, jedoch stehen zwei Hypothesen zur Diskussion. Zum einen kann die Bildung von S-Nitrosothiolen in den sauren Bedingungen des Magens durch Häm gefördert, der Stickstoff beim Eintritt in das alkalische Milieu des Dünndarms freigesetzt und dadurch die Nitrosierung von Häm-Eisen zu Nitrosylhäm stimuliert werden (Kuhnle *et al.*, 2007; Steinberg, 2019). Zum anderen steht die diätische Aufnahme von Häm-Eisen in Verdacht, die Anzahl nitratreduzierender Darmbakterien zu erhöhen (siehe 1.6 (Ijssennagger *et al.*, 2012a)).

Es wird vermutet, dass Häm-Eisen die Bildung endogener NOCs katalysiert. In Tierstudien wurde nach einer Häm-Eisenfütterung ein Anstieg fäkaler NOCs, die als *apparent total nitroso compounds* (ATNCs) bestimmt wurden, dokumentiert. Zu diesen ATNC zählen N-Nitrosoverbindungen (Nitrosamine, Nitrosamide), S-Nitrosoverbindungen und die Nitrosylhämverbindungen (Bastide *et al.*, 2015; Bastide *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 2003).

Im gastrointestinalen Trakt wird die Bildung von NOCs über die Nitrosierung von Aminen und Amiden, die durch bakterielle Decarboxylierung von nicht-resorbierten Aminosäuren entstehen, in Anwesenheit nitrosierender Agenzien induziert. Der Verzehr von rotem Fleisch fördert dabei, im Gegensatz zu weißem Fleisch, die Bildung solcher endogener NOCs in einer dosisabhängigen Weise (Bingham *et al.*, 2002; Bingham *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2001). Der Verzehr von Häm-Eisen bzw. Häm-Eisen-reichen Fleischsorten erhöht die Menge der gebildeten NOCs, gemessen an den ATNCs in Fäzes (Joosen *et al.*, 2009; Kuhnle *et al.*, 2007; Lewin *et al.*, 2006).

Bestätigend dazu wurde diätisches Häm-Eisen und nicht die im Fleisch enthaltenen Proteine oder anorganisches Eisen für diese Bildung der NOCs verantwortlich gemacht

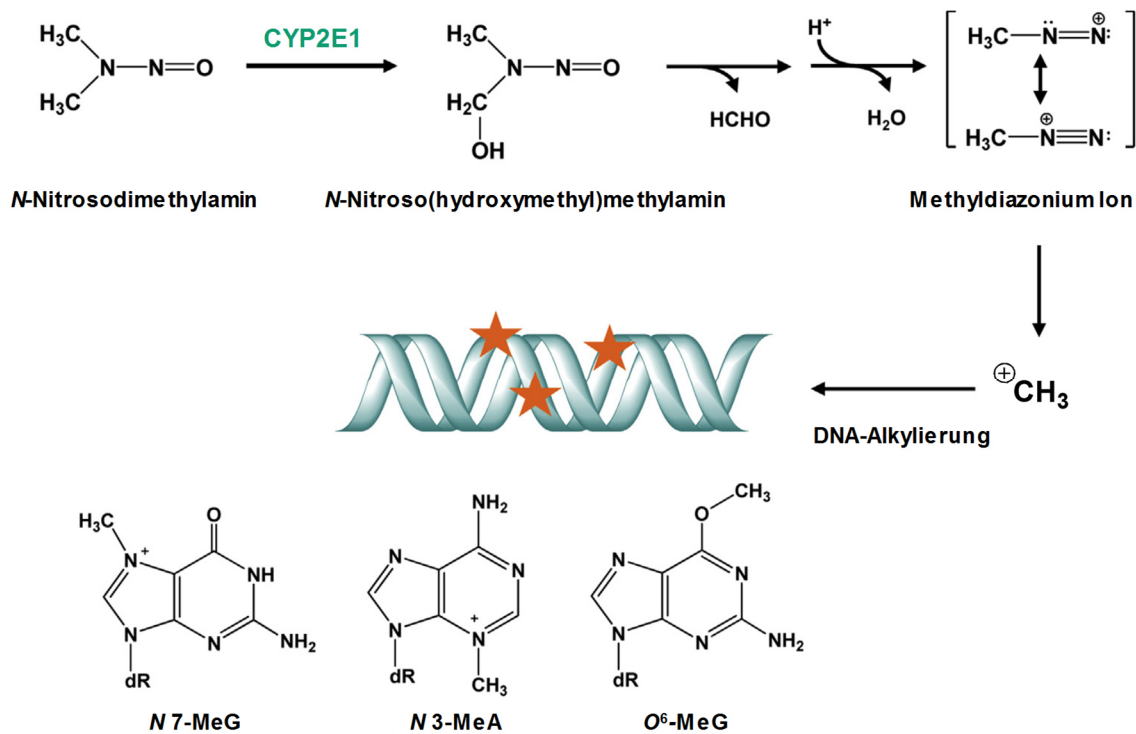


(Cross *et al.*, 2003). In einer Humanstudie zeigt die Analyse der fäkalen NOCs nach einer vegetarischen Ernährung im Vergleich zu einer Ernährung, die reich an rotem Fleisch ist, nur geringe Mengen fäkaler NOCs (Joosen *et al.*, 2009). *In vivo*-Fütterungsstudien mit Ratten bestätigten eine Hämoglobin-vermittelte Zunahme der fäkalen ATNCs (Bastide *et al.*, 2015).

*N*-Nitrosoverbindungen werden in einer chemischen Reaktion von Nitrit oder Stickstoffoxiden und sekundären Aminen oder *N*-Alkylaminen gebildet. NOCs kommen weitverbreitet in der Nahrung vor und wurden v.a. in verarbeitetem Fleisch, geräuchertem Fisch, Käse und Bier gefunden (Lijinsky, 1999). Die Menge der NOCs in Lebensmitteln steigt durch Verarbeitungsprozesse wie Pökeln und Erhitzen (Behnsnlian *et al.*, 2014). Zudem kommen NOCs exogen auch in Kosmetik und Tabakrauch vor und können endogen im Verdauungstrakt entstehen (Fahrer *et al.*, 2013).

Die Bildung endogener NOCs erfolgt im Magen und Dickdarm, durch die bakterielle Decarboxylierung von nicht-resorbierten Aminosäuren zu Aminen und deren anschließender Nitrosierung (Fahrer *et al.*, 2013). Zusätzlich kann durch CED die intestinale NOC-Produktion und damit verbunden das NO-Level steigen (de Kok *et al.*, 2005). Die gebildeten NOCs sind präkanzerogen und werden durch das Cytochrom P450 Enzym 2E1 (CYP2E1) durch Hydroxylierung am  $\alpha$ -C-Atom zu *N*-Nitroso-Hydroxymethyl-Methylamin umgewandelt und dadurch metabolisch aktiviert (Fahrer *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 1990). Die entstandenen instabilen Zwischenprodukte zerfallen zu höchst reaktiven Alkylcarbokationen unter Freisetzung von Aldehyd und molekularem Stickstoff ( $N_2$ ). Das Alkylcarbokation greift über eine nukleophile Substitution ( $S_N1$ -Mechanismus) die Stickstoff- und Sauerstoffatome der DNA an und induziert dadurch ein breites Spektrum an DNA-Alkylierungsschäden (Beranek, 1990; Fu *et al.*, 2012).

Die metabolische Aktivierung der NOCs und die Induktion der NOC-vermittelten DNA-Schäden sind in Abb. 8 am Beispiel von *N*-Nitrosodimethylamin dargestellt.



**Abbildung 8: Metabolische Aktivierung von NOCs und die Induktion von DNA-Schäden.**

NOCs, hier *N*-Nitrosodimethylamin, werden durch CYP2E1 hydroxyliert. Das gebildete *N*-Nitroso(hydroxymethyl)methylamin formt sich unter Abspaltung von Formaldehyd und Wasser zu einem instabilen Methyldiazonium-Ion. Dieses Zwischenprodukt zerfällt spontan in ein Methylcarbokation, welches die DNA alkylieren kann. Als Hauptprodukte entstehen hierbei *N*-Methylpurine (*N*7-MeG und *N*3-MeA) und mit einer geringeren Ausbeute *O*<sup>6</sup>-MeG. Modifiziert nach (Fahrer et al., 2017).

Obwohl *N*7-Methylguanin (*N*7-MeG) und *N*3-Methyladenin (*N*3-MeA) mit ca. 75 % die Hauptprodukte dieser Reaktion darstellen, zählen die prämutagenen Läsionen *O*<sup>6</sup>-MeG (6-8 %) und *O*<sup>6</sup>-CMG zu den bedeutendsten in der Dickdarmkrebsentstehung. Daneben werden in deutlich geringer Ausbeute *N*1-Methyladenin (*N*1-MeA), *N*3-Methylcytosin (*N*3-MeC, 1,5 %) und *O*4-Methylthymine (*O*4-MeT, 0,3 %) gebildet (Beranek, 1990; Fahrer et al., 2013; Fahrer et al., 2017). In murinen Fütterungsstudien wurde ein moderater Anstieg der *O*<sup>6</sup>-MeG-Läsionen im distalen Kolon nach einer Langzeitfütterung (18 Monate) mit Häm-Eisen nachgewiesen (Winter et al., 2014b). Diese Beobachtung wurde durch eine Humanstudie bestätigt, in der das rektale Gewebe nach einem täglichen Verzehr von 300 g rotem Fleisch für vier Wochen ein signifikant höheres *O*<sup>6</sup>-MeG-Level aufwies (Le Leu et al., 2015).

Während *O*<sup>6</sup>-MeG hauptsächlich durch *N*-Methyl-*N*-Nitrosoverbindungen gebildet werden, entstehen *O*<sup>6</sup>-CMG-Läsionen v.a. durch die Nitrosierung verschiedene Glycinderivate, die durch NO begünstigt werden (Cupid et al., 2004; Harrison et al., 1997; Shuker et al., 1997). Dabei spielen *S*-Nitrosothiole, die im sauren Magenmilieu durch Häm-Eisen verstärkt gebildet werden, eine wichtige Rolle. Unter den alkalischen Bedingungen des Dünndarms

wird anschließend NO abgespalten, das mit Häm-Molekülen zu Nitrosylhäm reagieren kann. Sowohl S-Nitrosothiole als auch Nitrosylhäm können als NO-Donor agieren und sind an der Nitrosierung von Glycinen beteiligt. Die instabilen Zwischenprodukte, die daraus resultierenden reaktiven alkylierenden Diazoacetate können an die DNA binden und O<sup>6</sup>-CMG, sowie O<sup>6</sup>-MeG in einem geringeren Umfang, bilden (Gottschalg *et al.*, 2007; Habermeyer *et al.*, 2015; Steinberg, 2019). Im humanen Gastrointestinaltrakt ist Glycin eine der häufigsten Aminosäuren, deren Nitrosierung die Hauptquelle der alkylierenden Agentien darstellen könnte. Die Bildung von O<sup>6</sup>-CMG geschieht v.a. innerhalb des Kolons und scheint abhängig von der Zusammensetzung des Darmmikrobioms zu sein (Vanden Bussche *et al.*, 2014). Die Häm-Eisen-vermittelte Induktion von O<sup>6</sup>-CMG wurde in exfolierten Kolonozyten bei freiwilligen Probanden nach dem Verzehr von rotem Fleisch bestätigt (Lewin *et al.*, 2006).

Obwohl N<sup>7</sup>-MeG das Hauptprodukt der NOC-vermittelten DNA-Alkylierung ist, besitzt es verglichen mit O<sup>6</sup>-MeG nur ein geringes mutagenes Potenzial (Elder *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu begünstigen unreparierte O<sup>6</sup>-MeG- und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen während der Replikation eine Basenfehlpaarung mit Thymin, wodurch Transitionsmutationen (G:C→A:T) entstehen können. Solche O<sup>6</sup>-MeG:T DNA-Fehlpaarungen werden durch Proteine der MMR erkannt (Duckett *et al.*, 1996), während O<sup>6</sup>-MeG-Addukte vor Replikation von MGMT repariert werden (siehe Kapitel 1.4.3). Aufgrund der mutagenen, klastogenen und kanzerogenen Eigenschaften der O<sup>6</sup>-MeG- und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen sind sie wichtige Biomarker nach einer NOC-Belastung. Eine Kohortenstudie unterstützt die Annahme, dass O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen mutagen sind und das KRK-Risiko steigern. Es wurde eine Korrelation zwischen dem Verzehr von Häm-Eisen und onkogenen Transitionsmutationen in den Genen *KRAS* und *APC* und des damit verbundenen erhöhten KRK-Risikos beobachtet (Gilsing *et al.*, 2013).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Verzehr von rotem Fleisch die Anzahl fäkaler NOCs und potenziell die damit verbundenen genotoxischen und kanzerogenen alkylierenden DNA-Läsionen wie O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG im Kolon erhöhen kann.

#### 1.4.2.2 Häm-induzierte direkte oxidative DNA-Schäden und Lipidperoxidation

Eine weitere Reaktion, die von Häm-Eisen katalysiert wird, ist die Fenton-Reaktion, in der ROS gebildet werden (Sadrzadeh *et al.*, 1984).

Die Reaktionsgleichung der Fenton-Reaktion ist in Abb. 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Fenton-Reaktion.**  
Dargestellt mit ChemDraw Ultra 12.0.

Hierbei gibt das zweiwertige Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ein Elektron an Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ab, wodurch ein Hydroxylanion und das reaktive Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) sowie oxidiertes Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) entstehen. Hydroxylradikale sind potente Oxidationsmittel, die mit Biomolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden interagieren und zur Induktion oxidativer Schäden führen (Sadrzadeh *et al.*, 1984).

Durch Addition der Hydroxylradikale an die Doppelbindungen der DNA-Basen wird ein Wasserstoffatom der C-H-Bindungen des Zuckermoleküls abgespalten und DNA-Läsionen, wie Einzelstrangbrüche, abasische DNA-Stellen und oxidierte DNA-Basen werden induziert (Cooke *et al.*, 2003). Aufgrund des geringsten Redox-Potenzials von Guanin wird es bevorzugt oxidiert, wodurch es zur ROS-vermittelten Bildung mutagener 8-OxoG-Läsionen kommen kann (Dizdaroglu *et al.*, 2012).

Zudem greifen die Hydroxylradikale v.a. die mehrfach ungesättigten Fettsäurereste (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) an, wodurch eine Abspaltung vom Wasserstoff der Kohlenstoffatome erfolgt und daraus Lipidperoxylradikale resultieren (Esterbauer *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 2011). Der Prozess der LPO besteht aus drei Schritten; der Initiations-, Propagations- und Terminationsphase. In der Initiationsphase abstrahiert das Hydroxylradikal dem ungesättigten Fettsäurerest den Allyl-Wasserstoff und bildet ein Lipidradikal ( $\text{L}^\bullet$ ) mit einem zentralen Kohlenstoff. Anschließend reagiert in der Propagationsphase das  $\text{L}^\bullet$  mit Sauerstoff zum Lipidperoxidradikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ), wodurch sich ein Wasserstoffatom von einem weiteren Lipidmolekül abspaltet, ein Lipidhydroperoxid ( $\text{LOOH}$ ) und ein weiteres  $\text{L}^\bullet$  in einer Kettenreaktion bildet. In der Terminationsphase wird diese Kettenreaktion beendet, beispielsweise durch Antioxidantien und deren Potenzial, Wasserstoffatome zu übertragen. Die Reaktion kann auch durch die Reaktion von mehreren  $\text{L}^\bullet$  miteinander beendet werden (Yin *et al.*, 2011).

Die Hauptprodukte der LPO von längeren PUFAs sind das hochreaktive Malondialdehyd (MDA) und das  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Aldehyd 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (Esterbauer *et al.*, 1991). MDA reagiert mit der DNA und bildet exozyklische DNA-Addukte mit 1,N2-Malondialdehyd-Deoxyguanin ( $\text{M}_1\text{dG}$ ) als Hauptaddukt (Chaudhary *et al.*, 1994; Marnett, 1999). 4-HNE bindet ähnlich wie MDA an die Aminogruppe des Deoxyguanin der DNA,

wodurch 4-HNE-Deoxyguanin (4-HNE-dG) entsteht (Esterbauer *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 2003).

### 1.4.3 Reparatur Häm-Eisen-induzierter DNA-Schäden

Wie im vorangegangenen Kapitel genauer beschrieben, katalysiert Häm-Eisen die Bildung endogener NOCs, wodurch die DNA an verschiedenen Positionen alkyliert werden kann. Die am häufigsten gebildeten *N*-Alkylierungs-DNA-Addukte *N*3-MeA, *N*3-MeG und *N*7-MeG können durch Proteine der Basenexzisionsreparatur (BER) erkannt und entfernt werden. Abhängig von der DNA-Läsion katalysieren unterschiedliche Glykosylasen substratspezifisch die Spaltung der *N*-glykosydischen Bindung (Kim *et al.*, 2012). Im ersten Schritt wird der DNA-Schaden durch die monofunktionale Alkyladenin DNA-Glykosylase (AAG) oder die Methylpurin DNA-Glykosylase (MPG) erkannt und entfernt (Chakravarti *et al.*, 1991; Engelward *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2012). Auch oxidierte DNA-Basen, wie 8-OxoG, die zu den Häm-induzierten Schäden gehören, werden über die BER durch die 8-OxoG Glykosylase 1 (OGG1) repariert (Kim *et al.*, 2012; Torti *et al.*, 2013). Anschließend wird die BER durch das Zusammenspiel verschiedener Enzyme, wie Endonukleasen, DNA-Polymerasen und Ligasen, abhängig davon, ob der lange oder der kurze BER-Reparaturweg benötigt wird, abgeschlossen (Christmann *et al.*, 2003). Eine mögliche protektive Rolle der BER in der Alkylanzien-induzierten Kolonkanzerogenese wurde mithilfe von AAG-defekten Mäusen untersucht (Meira *et al.*, 2008).

Die Reparatur der höchst mutagenen O<sup>6</sup>-MeG-DNA-Addukte ist in der Ätiologie von KRK von besonderer Bedeutung (1.2.2). Durch das Reparaturenzym O<sup>6</sup>-MeG-DNA-Methyltransferase (MGMT) wird in einem Ein-Schritt-Mechanismus die Methylgruppe vom Guanin direkt auf einen Cysteinrest in der katalytischen Einheit von MGMT reversibel übertragen, wodurch das Guanin demethyliert wird (Kaina *et al.*, 2007). Diese Übertragung der Methylgruppe auf MGMT resultiert in der Inaktivierung und dem anschließenden Ubiquitin-Proteasom-gekoppelten Abbau des Enzyms (Xu-Welliver *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist die Reparatur von O<sup>6</sup>-CMG-Addukten noch nicht vollständig entschlüsselt, jedoch deuten *in vitro*-Studien auf eine Beteiligung von MGMT bei dieser Reparatur hin (Senthong *et al.*, 2013). Unreparierte alkylierte DNA-Addukte, wie z.B. O<sup>6</sup>-MeG können während der Replikation Fehlpaarungen mit Thymin induzieren, die dann durch das MMR-System erkannt werden und in DNA-Strangbrüchen resultieren (Mojas *et al.*, 2007; Quiros *et al.*, 2010).

Die Häm-Eisen-induzierte Reaktion endogener LPO-Produkte mit der DNA bilden sperrige DNA-Addukte, wie M<sub>1</sub>dG und 4-HNE-dG (Feng *et al.*, 2003; Marnett, 1999). Diese DNA-

Addukte können aufgrund ihrer Größe und ihrer Eigenschaft die DNA-Helix zu verzerren sowohl die DNA-Replikation als auch die DNA-Transkription behindern (Brown *et al.*, 2001; Fahrer *et al.*, 2017). Die Reparatur dieser potenziell durch Häm-Eisen-induzierten sperrigen DNA-Schäden werden durch Proteine der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkannt und entfernt. Hierbei könnte das Reparaturprotein XPA (*Xeroderma pigmentosum*) von Bedeutung sein (Ayala *et al.*, 2014; Gueraud *et al.*, 2015; Iyama *et al.*, 2013; Marnett, 1999).

### 1.4.4 Häm-Eisen-induzierte Lipidperoxidation und Zytotoxizität

Die Häm-Eisen-katalysierte LPO ist, wie bereits oben beschrieben, für einen Anstieg des reaktiven Aldehyds MDA verantwortlich. Zur Bestimmung der LPO-Rate wird ein TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*)-Assay verwendet. Hierbei reagiert ein MDA-Molekül mit zwei Thiobarbitursäure (*thiobarbituric acid*, TBA)-Molekülen. Damit wird die Menge der TBARS als MDA-Äquivalente durch eine Absorptionsmessung des Butanolextraktes bei 532 nm bestimmt (Esterbauer *et al.*, 1991; Pierre *et al.*, 2003).

Sowohl MDA als auch 4-HNE werden als Biomarker für die Bewertung des KRK-Risikos eingesetzt. In zwei unterschiedlichen Tiermodellen zur Untersuchung der kolorektalen Kanzerogenese wurden nach peroraler Aufnahme von rotem Fleisch ein signifikanter Anstieg der LPO-Marker TBARS und HNE im Fäkalwasser und 1,4 Dihydroxynonan-Mercaptursäure (*dihydroxynonane mercapturic acid*, DHN-MA) im Urin nachgewiesen (Martin *et al.*, 2018). In derselben Studie ging ein täglicher Verzehr von 110 g frischem roten Fleisch für 4 Tage bei Menschen mit einer erhöhten Anzahl fäkaler LPO-Biomarker einher (Martin *et al.*, 2018). Die erhöhte Anzahl dieser Häm-induzierten LPO-Produkte korreliert dabei mit einer erhöhten Zytotoxizität des Kolonepithels und steht in Verdacht, Darmkrebs zu fördern (Martin *et al.*, 2018; Pierre *et al.*, 2006; Pierre *et al.*, 2010; Pierre *et al.*, 2003; Sawa *et al.*, 1998). Zudem bilden peroxidierte Lipide zusammen mit Häm den sogenannten zytotoxischen Häm-Faktor (*cytotoxic heme factor*, CHF) und verstärken die epitheliale Kolonproliferation (1.4.5 (Ijssennagger *et al.*, 2013; Sesink *et al.*, 1999, 2001)). In weiteren Studien wurde in diesem Zusammenhang die Beteiligung des APC-Gens untersucht. Mutationen im APC-Gen sind, wie bereits oben erwähnt, eines der frühesten Ereignisse der Initiation von Kolonkrebs (1.2.2 (Narayan *et al.*, 2003)). Hierbei bewirken Keimbahnmutationen das FAP, welches mit einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin korreliert (Clevers, 2004). Wildtypische Kolonozyten ( $APC^{+/+}$ ) zeigten gegenüber einer Behandlung mit 4-HNE eine erhöhte zytotoxische Sensitivität, wohingegen prä maligne Zellen mit einem heterozygoten APC-Status ( $APC^{min/+}$ ) resistent gegenüber 4-HNE waren. Dies ging in den mutierten APC-Zellen mit einer reduzierten Aktivität der Caspasen 3, 7 und 9 und einer

daraus resultierenden verringerten Apoptoseinduktion einher. Der Metabolismus könnte dadurch in präneoplastischen Zellen verstärkt ablaufen und KRK begünstigen (Baradat *et al.*, 2011; Bastide *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2003). Weiterhin führt eine Behandlung mit dem Fäkalwasser von Häm-Eisen-gefütterten Ratten zu einer verstärkten Zelltodinduktion in wildtypischen, intestinalen Zellen ( $APC^{+/+}$ ), wohingegen  $APC^{min/+}$ -Zellen reduzierte Zelltodraten aufwiesen (Bastide *et al.*, 2015). Dieser Häm-Eisen-vermittelte zytotoxische Stress im Kolongewebe könnte für eine verstärkte Proliferation des Kolonepithels, die nach Häm-Diäten beobachtet wurde, ursächlich sein (1.4.5 (Sesink *et al.*, 1999)). Es wurde gezeigt, dass 4-HNE ein geringeres mutagenes Potenzial als MDA aufweist, jedoch zytotoxischer ist (Bastide *et al.*, 2011). Mithilfe von *in vitro*-Studien wurde nachgewiesen, dass die Komponenten des Fäkalwassers nach einer Häm-Eisendiät wie MDA, 4-HNE und Hydroperoxid Apoptose in nicht-malignen und kanzerogenen Darmzellen induzieren (Awasthi *et al.*, 2003; Leuratti *et al.*, 2002; Schaeferhenrich *et al.*, 2003).

Der bestehende Zusammenhang zwischen der Häm-Eisen-induzierten luminalen LPO und der Zusammensetzung des Darmmikrobioms wurden mithilfe von *in vivo*-Studien mit einer Häm-Eisendiät zusammen mit einer Antibiotika-Gabe untersucht (1.4.6 (Ijssennagger *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015)).

#### 1.4.5 Häm-Eisen-vermittelte Hyperproliferation des Kolonepithels

Autoradiographische Analysen mit  $[H]^3$ Thymidin lieferten erste Beweise für eine verstärkte Proliferation des Kolonepithels nach einer Häm-Eisen-haltigen Diät in Ratten (Sesink *et al.*, 1999). Der diätische Zusatz von Calcium verhinderte die Häm-induzierte Hyperproliferation des Kolonepithels, wodurch Calcium als chemoprotektive Substanz in der Kolonkarzinogenese wirken könnte (Sesink *et al.*, 2001). Übereinstimmend dazu zeigten weitere *in vivo*-Studien mit moderaten, physiologisch relevanten Häm-Eisen-Konzentrationen (0,2 und 0,5  $\mu$ mol Häm/g Diät) eine Häm-Eisen-vermittelte Steigerung der Proliferation mit anschließender Bildung von Hyperplasien im murinen Kolonepithel. In diesem Zusammenhang wurde eine Häm-Eisen-vermittelte Veränderung der Signalkaskade von luminalen Epithelzellen zu Kolonkrypten mit einer verstärkten Expression des Proliferationsinhibitors *WNT-inhibierender Faktor 1* (*Wif-1*) und des *bone morphogenetic protein 2* (*BMP-2*) dokumentiert (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Mithilfe von Transkriptomanalysen wurden zudem nach einer Häm-Eisendiät eine kryptspezifische Expressionssteigerung der Zellzyklusgene *Cyclin E1*, *A2* und *B2* entschlüsselt (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Die Häm-vermittelte Hyperproliferation wurde durch die Verwendung verschiedener Marker in Mäusen mehrfach in unabhängigen Studien bestätigt



(de Vogel *et al.*, 2005; de Vogel *et al.*, 2008; Ijssennagger *et al.*, 2012a; Sesink *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 2014b).

Der WNT-Signalweg spielt in der Aufrechterhaltung pluripotenter Stammzellen in den Kolonkrypten eine essentielle Rolle. Wie in 1.2.2. bereits erwähnt, stellt die aberrante Aktivierung dieses Signalweges eines der wichtigsten initialen Ereignisse der kolorektalen Kanzerogenese dar. In APC-defizienten kolorektalen Karzinomzelllinien verursachte sowohl anorganisches Eisen als auch Häm-Eisen eine Aktivierung des WNT-Signalwegs (Brookes *et al.*, 2008).

Ijssennagger *et al.* sehen die gesteigerte Häm-Eisen-induzierte Proliferation als Regenerationsmechanismus an, um die Häm-Eisen-vermittelte Schädigung der Kolonepithelzellen zu kompensieren. Dabei werden die geschädigten Zellen aus den Stammzellen der Kolonkrypten ersetzt. Zusammen mit der durch Häm-Eisen-vermittelten reduzierten Apoptoserate und dieser kompensatorischen Hyperproliferation, kann Häm-Eisen zu Hyperplasien des Kolonepithels führen und damit das KRK-Risiko erhöhen (Ijssennagger *et al.*, 2012b). Durch die Gabe eines Breitbandantibiotikums wurde entdeckt, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms für eine Häm-Eisen-vermittelte Hyperproliferation verantwortlich ist. Die Antibiotikagabe bewirkte dabei die komplette Aufhebung der Häm-Eisen-induzierten Hyperproliferation (1.5 (Ijssennagger *et al.*, 2015)).

### 1.4.6 Häm-Eisen in der kolorektalen Tumorgenese

Epidemiologische Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von rotem, Häm-Eisen-reichen Fleisch und potenziell darmkrebsfördernde Mechanismen hin (Bouvard *et al.*, 2015; Norat *et al.*, 2005; Norat *et al.*, 2002). Diese Annahme wurde in einer prospektiven Kohorten-Studie bestätigt, bei der die Häm-Eisenaufnahme positiv mit dem Risiko für kolorektale Adenome korrelierte (Bastide *et al.*, 2016).

Eine Häm-Eisendiät führte in Ratten zu einem Anstieg und Promotion der präkanzerogenen Markern ACF und Mucin-depletierten Foci (MDF), die mit einer TBARS-vermittelten Zytotoxizitätssteigerung verbunden war (Pierre *et al.*, 2006; Pierre *et al.*, 2003). Diese aberranten Foci in der Kolonmukosa sind Tumorstufen, die typischerweise als Marker für die frühe Analyse von Neoplasien während der Kolonkanzerogenese verwendet werden (1.2.2). In AOM-initiierten Ratten bewirkte diätisches Häm-Eisen eine Promotion der AOM-induzierten ACF im Kolon. Eine Häm-Eisendiät zeigte in äquimolarer Konzentration eine potentere Promotion der AOM-induzierten Darmtumore als eine Hämoglobindiät. Durch diesen promovierenden Effekt von Häm-Eisen auf die Kolonkanzerogenese bezüglich der ACF-Induktion, wird die Annahme eines erhöhten



Darmkrebsrisikos durch den Verzehr von rotem Fleisch unterstützt (Pierre *et al.*, 2003). Auch der Verzehr von frischem, rotem Fleisch steigert sowohl in AOM-initiierten Ratten die Größe der MDF als auch in *APC<sup>min/+</sup>* Mäusen die Anzahl und Größe intestinaler Tumore. In diesen Kanzerogenese-Tiermodellen wurde die fleischinduzierte Darmkrebsförderung mit einer verstärkten Lipidperoxidation (fäkale TBARS, HNE, urinären DHN-MA) in Verbindung gebracht (Martin *et al.*, 2018). In *APC<sup>min/+</sup>* Mäusen verdoppelte die eine Hämoglobinangereicherte (2,5 % Hämoglobin  $\triangleq$  ~1,5  $\mu$ mol Häm/g Diät) Diät die intestinale Tumoranzahl (Bastide *et al.*, 2015). Übereinstimmend mit vorherigen Studien, die fördernde Effekte von Hämoglobin oder lyophilisiertem roten Fleisch auf die Entstehung präkanzerogener Läsionen zeigten, korrelierten die Läsionen ACF oder MDF mit einer erhöhten fäkalen Lipidperoxidation (Bastide *et al.*, 2015; Pierre *et al.*, 2004; Pierre *et al.*, 2010; Pierre *et al.*, 2003).

Bereits ältere Studien zeigten in Ratten, die mit *N*-Nitroso-*N*-Methylharnstoff intrarektal behandelt wurden, eine erhöhte Anzahl von Darmtumoren nach einer Diät mit hohen Häm-Eisenmengen (1,86  $\mu$ mol Häm/g Diät (Sawa *et al.*, 1998)). Diese Häm-Eisen-vermittelte tumorpromovierende Eigenschaft auf kolorektale Tumore wurde zudem in Kombination mit dem klassischen AOM/DSS-Kanzerogenese-Modell in C57BL/6J-Mäusen untersucht. Hier induzierte Häm-Eisen (ca. 0,45  $\mu$ mol Häm/g Diät) nach 88 Tagen ein erhöhtes Wachstum kolorektaler Tumore (Constante *et al.*, 2017).

Konträre Befunde wurden mit dem *APC<sup>min/+</sup>* Mausmodell basierend auf einem *A/J* genetischen Hintergrund beobachtet. Diese Mäuse entwickeln, verglichen mit dem klassischen C57BL/6J-Modell, basal vermehrt Kolontumore (Sodring *et al.*, 2016). Interessanterweise führte diätisches Häm-Eisen (0,5  $\mu$ mol/g Diät) über 56 Tage in diesem Mausmodell zu einer leicht erhöhten Anzahl von Dünndarntumoren, während die Anzahl der kolonständigen ACF und Kolontumore abnahm (Sodring *et al.*, 2015). Diese gegenteiligen Befunde könnten aus den unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Modellsysteme resultieren.

Tabelle 3 zeigt eine zusammenfassende Übersicht der Häm-Eisen-vermittelten Mechanismen in der kolorektalen Kanzerogenese von *in vivo*-Studien.

**Tabelle 3: Einfluss von diätischem Häm auf die Entstehung von Darmtumoren**

Spezies	Diät/Behandlung	Dauer	Ergebnisse	Referenz
Ratte (F344)	1,86 µmol Häm/g Diät (Hämoglobin) 2 mg <i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -Methylharnstoff (initial 6x intrarektal)	36 Wochen	↑ Darmtumore	(Sawa <i>et al.</i> 1998)
Ratte (F344)	0,0198 µmol Häm/g Diät (Kochschinken) 190 mg/kg KG 1,2Dimethylhydrazin <i>i.p.</i>	100 Tage	↑ ACF ↑ MDF	(Pierre <i>et al.</i> 2010)
Ratte (F344)	Rotes Fleisch 20 mg/kg KG AOM	~100 Tage	↑ MDF-Größe	(Martin <i>et al.</i> , 2018)
Ratte (F344)	0,25/0,5/1,5 µmol Häm/g Diät (Hämin) 1,5/3 µmol Häm/g Diät (Hämoglobin) 20 mg/kg KG AOM <i>i.p.</i>	100 Tage	Hämin: ↑ Anzahl + Größe ACF Hämoglobin: ↑ Anzahl ACF	(Pierre <i>et al.</i> 2003)
Ratte (F344)	0,36 µmol Häm/g Diät (Rindfleisch) 190 mg/kg KG 1,2Dimethylhydrazin <i>i.p.</i>	100 Tage	↑ ACF ↑ MDF	(Pierre <i>et al.</i> 2008)
Maus (C57B/6)	0,45 µmol Häm/g Diät (Hämin) 10 mg/kg KG AOM <i>i.p.</i> 2 % DSS (3x 5 Tage)	88 Tage	↑ kolorektale Adenombildung	(Constante <i>et al.</i> 2017)
Maus ( <i>APC<sup>min/+</sup></i> )	Rotes Fleisch	45 Tage	↑ Anzahl + Größe intestinaler Tumore	(Martin <i>et al.</i> , 2018)
Maus ( <i>Apc<sup>min/+</sup>/Apc<sup>+/+</sup></i> )	~1,5 µmol Häm/g Diät (Hämoglobin)	49 Tage	↑ MDF ↑ Dünndarmtumore ( <i>APC<sup>min/+</sup></i> )	(Bastide <i>et al.</i> 2015)
Maus ( <i>A/J<sup>min/+</sup></i> )	0,5 µmol Häm/g Diät (Hämin)	56 Tage	↓ Tumor (Kolon) ↑ Tumor (Dünndarm)	(Sodring <i>et al.</i> , 2015)

Protektive Effekte gegenüber der Häm-Eisen-vermittelten Kolonkanzerogenese wurden nach Zusatz von diätischem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder Chlorophyll bzw. Antioxidantien beobachtet, die diätisches Häm-Eisen präzipitieren und dadurch die Effekte abschwächen (Pierre *et al.*, 2008; Pierre *et al.*, 2003; Sesink *et al.*, 2001).

Zusammengefasst deuten sowohl die epidemiologischen als auch die Nagerstudien vermehrt auf eine Häm-Eisen-vermittelte Promotion präkanzeroger Marker wie ACF und MDF und eine Förderung des Wachstums kolorektaler Tumore hin. Bislang gibt es keinerlei Anzeichen für tumorinitiierende Eigenschaften von diätischem Häm-Eisen in physiologisch relevanten Mengen.

## 1.5 Das intestinale Mikrobiom und die Beeinflussung durch (Häm-)Eisen

Das intestinale Mikrobiom ist essentiell für die Gesundheit des Menschen und stellt mit bis zu  $1 \times 10^{14}$  Bakterien das größte Bakterienvorkommen im Körper dar, wobei der Großteil davon im Kolon zu finden ist (Ley *et al.*, 2006). Es besteht aus einer Vielzahl unterschiedlichster Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Viren, und übernimmt essentielle Funktionen des Wirtsnährstoffmetabolismus. Weiterhin hat das Mikrobiom einen wichtigen Einfluss auf den Arzneimittelmetabolismus sowie die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der intestinalen Mukusschicht. Die kommensalen Darmbakterien übernehmen essentielle Funktionen bei der Entwicklung des Wirtsimmunsystems (1.6 (Becker *et al.*, 2015; Jandhyala *et al.*, 2015; Kamada *et al.*, 2013)). Eine lange Zeit wurde der Einfluss des Mikrobioms als potenzieller Promotor in der Krebsentstehung außer Acht gelassen, wohingegen seine Bedeutung in aktuellen Studien als Forschungsschwerpunkt stark gestiegen ist. Die immense Bedeutung des Darmmikrobioms wird durch dessen Beteiligung in pathophysiologischen Prozessen wie CED deutlich (Kamada *et al.*, 2013).

Das Mikrobiom ist stark von einer nährstoffreichen Umgebung abhängig, die durch den Wirt bereitgestellt wird. Im Gegenzug versorgen Bakterien des Mikrobioms den Wirt mit kurzkettigen Fettsäuren und Vitaminen (insbesondere Vitamin K (Matsuoka *et al.*, 2015)). Generell benötigen Mikroorganismen Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor, wobei das Eisenvorkommen ein wichtiger Virulenzfaktor sein kann (Weinberg, 2009). Mikroorganismen benötigen, wie auch andere Individuen, Eisen als Co-Faktor für wichtige zelluläre Prozesse, einschließlich der DNA-Replikation. Für eine effiziente Eisenaufnahme entwickelten Bakterien unterschiedliche Mechanismen. Beispielsweise werden selektive Eisenchelatoren, sogenannte Siderophore, als Antwort auf einen Eisenmangel abgesondert (Raymond *et al.*, 2003; Weinberg, 2009). Das von Enterobakterien synthetisierte Enterobactin ist ein solcher Vertreter der Siderophore und besitzt eine hohe Affinität zu  $\text{Fe}^{3+}$ . Der Siderophorenkomplex bindet an ein Rezeptorprotein der mikrobiellen Oberfläche und gibt das Eisen in einem esterasevermittelten Prozess ins Zytoplasma ab (Raymond *et al.*, 2003). Siderophore dienen gramnegativen Bakterien als (Häm-) Eisenaufnahmemechanismus, der in einer ATP-abhängigen Weise abläuft. Im Gegensatz dazu verläuft der Häm-Eisentransport in grampositiven Bakterien über eine komplizierte Kaskade von Häm-Transferproteinen in einem energieunabhängigen Mechanismus (Braun *et al.*, 2011).

Das Mikrobiom eines gesunden Menschen setzt sich zu mehr als 90 % aus vier Hauptphyla zusammen, deren Vertreter hauptsächlich anaerobe Bakterien sind, zusammen. Die meisten davon gehören den grampositiven *Firmicutes*, den gramnegativen *Bacteroidetes*

und zu geringeren Anteilen den gramnegativen *Proteobacteria* und grampositiven *Actinobacteria* an (Qin *et al.*, 2010).

Die diätische Aufnahme von Häm-Eisen beeinflusst sowohl die Zusammensetzung als auch die Diversität des intestinalen Mikrobioms, was in einer sogenannten mikrobiellen Dysbiose resultiert. Eine Häm-Eisen-haltige Diät verändert die Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Mäusen in der Weise, wie sie bei chronischen Darmentzündungen wie CED oder KRK gefunden werden (Constante *et al.*, 2017). Die Anzahl der gramnegativen Bakterienphyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobiota* steigt durch Häm-Eisen an, während grampositive Bakterien wie *Actinobacteria* und *Firmicutes* abnehmen. Das dadurch veränderte Verhältnis der *Bacteroidetes* zu *Firmicutes* dient als Marker der bakteriellen Dysbiose (Constante *et al.*, 2017; Ijssennagger *et al.*, 2012a). Diese Verschiebung in Richtung einer erhöhten Anzahl gramnegativer Stämme kann durch eine selektive Anfälligkeit der grampositiven Bakterien gegenüber Häm-Eisen-induzierten zytotoxischem Fäkalwasser zustande kommen (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Dadurch können sich die Lipopolysaccharid (LPS)-produzierenden gramnegativen Bakterien ungehindert vermehren, wodurch ihnen ein Wachstumsvorteil entsteht. Die Kolonozyten werden bei mehr gramnegativen Bakterien folglich einer erhöhten Menge an LPS ausgesetzt (Constante *et al.*, 2017; Ijssennagger *et al.*, 2015; Ijssennagger *et al.*, 2012a).

Des Weiteren wurden Häm-induzierte Änderungen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms mit einer verstärkten luminalen LPO und einer Hyperproliferation der Kolonkrypten in Verbindung gebracht (Ijssennagger *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015). Durch die Unterdrückung der Darmbakterien mittels Antibiotikagabe wurde die Bildung Häm-Eisen-vermittelter fäkaler TBARS reduziert, sowie die Häm-induzierte Hyperproliferation und Hyperplasie in Mäusen komplett aufgehoben (1.4 (Ijssennagger *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015)). Zudem bewirkt eine Häm-Eisendiät einen Anstieg der muzindegradierenden Bakterien *Akkermansia mucinphila*, woraufhin die Durchlässigkeit der Mukusbarriereschicht steigt und das Kolonepithel luminal direkt den Häm-induzierten toxischen Substanzen und dem CHF ausgesetzt ist. Kompensatorisch steigt daraufhin die Proliferationsrate des Kolonepithels (Ijssennagger *et al.*, 2015). Darmbakterien sind somit in der Lage, durch die Modulierung von oxidativem und zytotoxischem Stress oder direkt über die Zerstörung der Mukusbarriereschicht die Hyperproliferation des Kolons zu beeinflussen (Ijssennagger *et al.*, 2015; Ijssennagger *et al.*, 2012a). Daher ist der protektive Effekt einer Antibiotikatherapie bezüglich LPO und Hyperproliferation abhängig von einer Mukusschicht, die ohne Antibiotikagabe durch sulfidproduzierende und muzindegradierende Bakterien abgebaut werden würde (Ijssennagger *et al.*, 2015;

ljssennagger *et al.*, 2012a). Darauf basierend scheint eine Korrelation zwischen der Häm-induzierten Änderung der Mikrobiomzusammensetzung und der Häm-induzierten epithelialen Proliferation der Kolonozyten zu bestehen. Die Häm-Eisen-induzierte unvorteilhafte Veränderung des Mikrobioms gleicht einer Dysbiose, wie sie charakteristisch für eine DSS-induzierte Kolitis ist (Constante *et al.*, 2017).

### 1.5.1 Einfluss des Mikrobioms auf die Dickdarmkrebsentstehung

Das intestinale Mikrobiom kann mit chronischen Darmentzündungen und der kolorektalen Kanzerogenese in Verbindung gebracht werden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen invasiven polymikrobiellen Biofilmen und einer Förderung von Gewebsentzündungen. Es wurden Biofilme, darunter Vertreter der Bakterienstämme *Fusobacterium nucleatum* und der enterotoxischen *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), mit einer verstärkten Bildung proximaler Kolonkarzinome in Verbindung gesetzt. Zudem zeigt ein biofilmpositives Gewebe eine verstärkte proonkogene, epitheliale Permeabilität mit einer verstärkten epithelialen Interleukin (IL) 6-Produktion, was kausal mit einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten zusammenhängt (Dejea *et al.*, 2014). Einhergehend damit wurde ein Anstieg der *Fusobacteria* in KRK-Geweben mit einer erhöhten MSI, Mutationen in den Onkogenen *BRAF* und *KRAS* sowie des Tumorsuppressorgens *p53* in Verbindung gebracht (Tahara *et al.*, 2014).

Zusätzlich können auch bakterielle Genotoxine in der Ätiologie von KRK beteiligt sein. Die enterotoxischen *B. fragilis* sondern das zinkabhängige Metalloproteasetoxin BFT (*B. fragilis* Toxin) ab, welches in Verdacht steht, das Tumorstadium durch Verstärkung des WNT-Signalweges und damit die Proliferation im Kolonepithel zu beeinflussen. BFT verstärkt dabei die nukleare Signalgebung von  $\beta$ -Catenin, was die Transkription des Onkogens *c-myc* induziert und die Proliferation des Kolonepithels steigert (Rhee *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2003). *In vitro*-Studien enthüllen neben der BFT-induzierten Proliferationssteigerung zusätzlich eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und DNA-Schäden, die mit einer KRK-Prädisposition korrelieren könnten (Housseau *et al.*, 2010; Toprak *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2003). Bestätigend dazu wird ein erhöhtes *B. fragilis*-Vorkommen in KRK-Patienten beobachtet (Toprak *et al.*, 2006). Wu und Kollegen vermuten, dass eine Langzeitexposition mit enterotoxischen *B. fragilis*-Stämmen zu chronischen Kolonerkrankungen wie einer verstärkten Darmentzündung und einer onkogenen Transformation des Kolongewebes führt (Wu *et al.*, 2003).

Im Zusammenhang mit KRK wurde ein weiteres bakterielles Genotoxin, das Cyclomodulin *Colibactin*, gefunden. Es wird von den Polyketidsynthasen der *Enterobacteriaceae*, v.a. der intestinalen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme produziert. *Colibactin* induziert DNA-

Strangbrüche, chromosomale Aberrationen sowie einen Zellzyklusarrest, wodurch es im Verdacht steht, die kolorektale Kanzerogenese zu fördern (Bossuet-Greif *et al.*, 2018; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Fais *et al.*, 2018; Nougayrede *et al.*, 2006). In murinen KRK-Modellen erhöht *Colibactin* die kolorektale Tumoranzahl und steht im Zusammenhang mit einem vermehrten Vorkommen von *Colibactin*-produzierenden *E. coli*-Stämmen, die in KRK-Biopsien gefunden wurden (Buc *et al.*, 2013; Cougnoux *et al.*, 2014; Fais *et al.*, 2018). Neben *Colibactin* zählt auch das *cytolethal distending toxin* (CDT), welches von einer Vielzahl gramnegativer Bakterien produziert wird, zu den bakteriellen Genotoxinen. Seine direkte DNA-schädigende Wirkung durch die intrinsische DNase-ähnliche Aktivität resultiert in gesteigerten Zelltodraten verschiedener Zelllinien (Fahrer *et al.*, 2014; Guerra *et al.*, 2011; Lara-Tejero, 2001; Seiwert *et al.*, 2017). Eine chronische Exposition mit geringen, subletalen CDT-Dosen bewirkt zudem eine genetische Instabilität *in vitro* (Guidi *et al.*, 2013). Das als Radiomimetikum bezeichnete CDT induziert neben DNA-Schäden auch eine genomische Instabilität in Fibroblasten und KRK-Zellen, die mit strahlungsinduzierten DNA-Schäden vergleichbar sind. Es wurde gezeigt, dass CDT-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche Autophagie in KRK-Zellen induzieren und somit mögliche Implikationen für eine DNA-schadensinduzierte Kanzerogenese oder Radiokrebstherapie darstellen könnten (Fahrer *et al.*, 2014; Seiwert *et al.*, 2017).

Auch das grampositive Darmbakterium *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) wurde mit der Förderung der chromosomalen Instabilität durch Bildung extrazellulärer Superoxide in Verbindung gebracht und spielt daher eine mögliche Rolle in der Promotion von KRK. *In vivo*-Studien zeigten, dass eine *E. faecalis*-Infektion in IL10<sup>-/-</sup> Mäusen neben entzündlichen Darmerkrankungen auch rektale Dysplasien und Adenokarzinome induziert. IL10 ist meist für die Hemmung einer Entzündungsreaktion verantwortlich (1.6 (Balish *et al.*, 2002)).

Des Weiteren sind Darmbakterien häufig mit der endogenen Bildung von NOCs im Darm verknüpft. Dadurch könnte das Mikrobiom sowohl bei der Darmkrebsinitiation als auch bei der Tumorprogression durch Beeinflussung der intestinalen Entzündung und der Aktivierung tumorassoziierter Signalwege beteiligt sein (Arthur *et al.*, 2012; Dejea *et al.*, 2014; Hold *et al.*, 2015; Schwabe *et al.*, 2013). Die Cytochrom-cd1-Nitritreduktaseaktivität unterschiedlicher intestinaler Bakterienstämme katalysiert die Bildung von NOCs durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und NO-ähnlichen Verbindungen (Calmels *et al.*, 1996). Ob Häm-Eisen einen Einfluss auf genotoxische Bakterienstämme hat wurde, ist bis dato nicht untersucht.

## 1.6 Das intestinale Immunsystem und die mögliche Beeinflussung durch Häm-Eisen

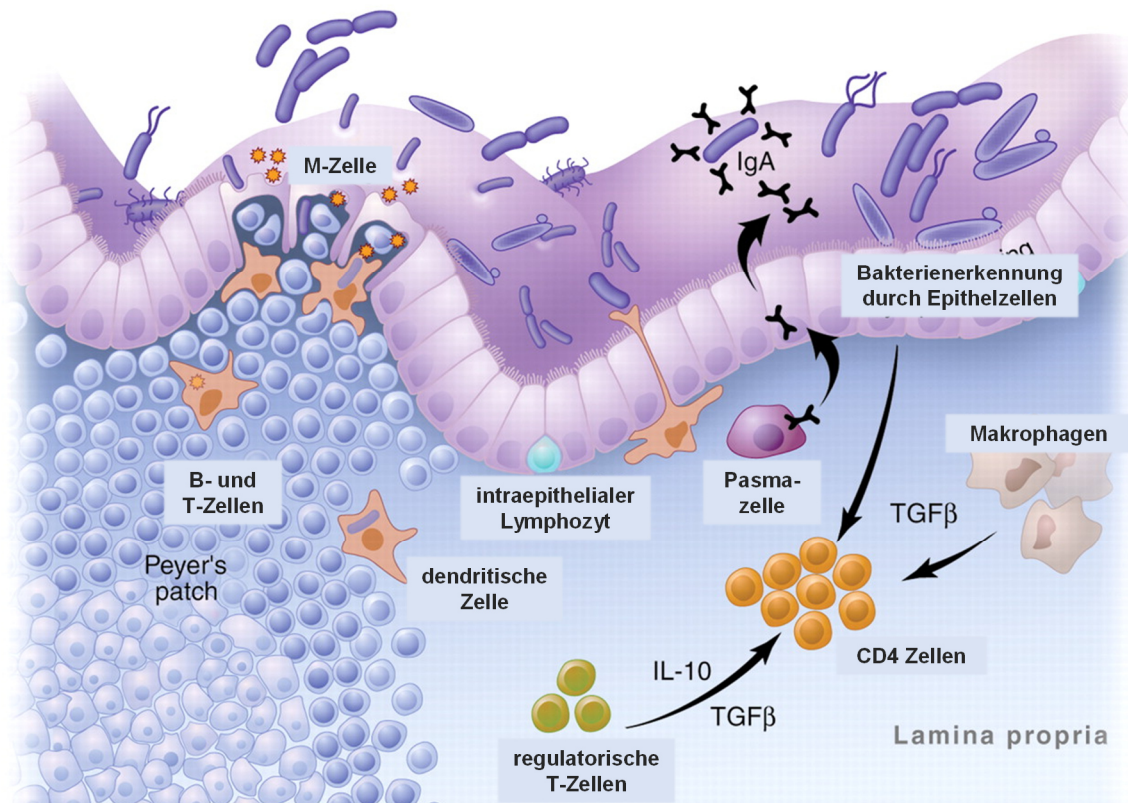
Das einschichtige Darmepithel stellt eine Schutzbarriere gegenüber dem hohen Bakterienvorkommen, der meist kommensalen, aber gelegentlich auch pathogenen Bakterienstämme, des intestinalen Lumens dar. Bei der nicht-immunologischen Abwehr von Mikroorganismen spielen die unterschiedlichen intestinalen Zelltypen eine essentielle Rolle. Die intestinalen Becherzellen regulieren durch die Produktion von Muzinen und anderer Sekrete die parazelluläre Permeabilität des Darmepithels. Sie bilden zusammen mit den Paneth-Zellen, die für die Synthese antimikrobieller Peptide (u.a. Defensine) verantwortlich sind, eine physikalische Barriere gegenüber dem Darminhalt (Elphick *et al.*, 2005; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004). Um Pathogene effizient erkennen und entfernen zu können, werden komplexe Immunantworten vom Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) aktiviert, wobei eine Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen und unterschiedliche Effektor- bzw. regulatorische T-Zellen beteiligt sind (Sanz *et al.*, 2009). Das GALT besteht aus etlichen Immunzelltypen, wie Lymphozyten, Antigen (AG)-präsentierenden dendritischen Zellen (DCs) und phagozytierenden Makrophagen, die meist in spezialisierten Strukturen organisiert sind. Diese lymphatischen Strukturen sind die im Dünndarm vorkommenden *Peyer's Patches*, sowie die isolierten intestinalen Lymphfollikel, die verstreut innerhalb der LP vorkommen. Das LP-spezifische GALT beinhaltet DCs und hauptsächlich CD4<sup>+</sup> T-Helfer (T<sub>H</sub>) Zellen, wohingegen im intestinalen intraepithelialen Kompartiment vermehrt zytotoxische CD8α<sup>+</sup> T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) vorkommen. Die LPL stellt die größte Anzahl aktiver mukosaler Immunzellen im Körper dar. Sie setzen sich aus den Immunglobulin A (IgA)-produzierenden B- und Plasmazellen, sowie den Makrophagen und DCs zusammen (Fagarasan *et al.*, 2003; Luongo *et al.*, 2009). Der Antikörper IgA wird von den Stromazellen der LP sekretiert und anschließend durch das Epithel transportiert. Dort dient er als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene und ist für die Homöostase der Darmflora verantwortlich (Fagarasan *et al.*, 2003). Die intestinale LP beinhaltet ca. 80 % aller Plasmazellen (Fagarasan *et al.*, 2003; Luongo *et al.*, 2009). Diese gehen aus B-Zellen hervor, die in den *Peyer's Patches* und mesenterialen Lymphknoten bzw. Lymphfollikeln unter der Kontrolle des Zytokins TGFβ aktiviert werden (Murphy *et al.*, 2018).

Die innerhalb der *Peyer's Patches* und der LP vorkommenden DCs sind die in Mäusen häufigste CD11b-exprimierende Subgruppe, die nach ihrer Aktivierung dazu neigen, IL-23 zu produzieren (Murphy *et al.*, 2018). DCs nehmen ständig Antigene aus dem Darmlumen auf und präsentieren diese den naiven T-Zellen, nach Wanderung zu den ableitenden



mesenterialen Lymphknoten. Diese werden dadurch angeregt, sich zu AG-spezifischen regulatorischen FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>) zu differenzieren, die zur Darmwand zurückkehren und eine Entzündungsreaktion gegenüber harmlosen kommensalen Bakterien zu unterdrücken (Murphy *et al.*, 2018).

Abb. 10 zeigt eine Übersicht des intestinalen Immunsystems, sowie die Verteilung und Lokalisierung ausgewählter Immunzellen.



**Abbildung 10: Das Darm-assoziierte Immunsystem.**

Intestinale Bakterien des Darmlumens interagieren mit den Immunzellen der Darmwand, die die Bakterien erkennen und eine ständige Immunstimulation mit IgA-Ausschüttung induzieren. Dendritische Zellen der LP nehmen durch die Epithelzellen Kontakt zu Darmbakterien auf. Modifiziert nach (Macdonald *et al.*, 2005).

Die LP eines gesunden Darms beinhaltet die größte Makrophagenpopulation im Körper (Murphy *et al.*, 2018). Sie sind dort direkt unter den Epithelzellen lokalisiert und für die Aufrechterhaltung der Homöostase des gesunden Darms verantwortlich. Außerdem besitzen sie eine hohe phagozytotische Aktivität, wodurch sie v.a. bei der Aufnahme und dem Abbau eingedrungener Mikroorganismen und abgestorbener Epithelzellen beteiligt sind (Bain *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2018). Darmmakrophagen produzieren große Mengen an IL10, was für das Überleben und die sekundäre Vermehrung der FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> notwendig ist. Dadurch wird die antigenspezifische Toleranz aufrechterhalten (Bain *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2018). IL10 kann weiterhin proinflammatorische Signale durch eine



verstärkte Expression negativer Regulatoren von NFκB reduzieren (Hirota *et al.*, 2005). Im GALT findet eine ständige Erneuerung der Darmmakrophagen aus Monozyten aus dem Blut statt. Die IEL stellen die größte Einzelzellpopulation an Lymphozyten im Körper dar und sind überwiegend aus CD8α<sup>+</sup> CTLs (~85 %) zusammengesetzt, die für die Beseitigung eines Entzündungsherdes verantwortlich sind (Murphy *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018).

Kommensale Darmbakterien haben einen großen Einfluss auf die Entwicklung und die Regulation des intestinalen Immunsystems. Die Behandlung von Ratten mit einer probiotischen Mischung aus *Lactobacillus*-, *Bifidobacteria*- und *Streptococcus*-Arten zeigt eine Steigerung des luminalen Muzingehaltes, wodurch die Mukusbarriere verstärkt wird. Des Weiteren korreliert die probiotische Exposition isolierter Kolonschleifen aus Ratten mit einer gesteigerten Mucin-Genexpression (*MUC2*) (Caballero-Franco *et al.*, 2007). Probiotische Bakterienstämme tragen somit zur Aufrechterhaltung der Integrität der Darmwand bei.

*In vivo*-Studien zeigten eine proinflammatorische Wirkung von diätischem Häm-Eisen in Kombination mit einer DSS- und TNBS-ausgelösten Kolitis in Mäusen und Ratten (Constante *et al.*, 2017; Schepens *et al.*, 2011). Eine direkte Induktion einer Darmentzündung durch Häm-Eisen-haltiges Futter allein konnte in vorherigen Studien nicht beobachtet werden (Ijssennagger *et al.*, 2012b). Im Unterschied dazu zeigt sowohl diätisches als auch *i.p.* verabreichtes Häm-Eisen durch seine Beteiligung in der Expressionssteigerung von HO-1 antiinflammatorische Eigenschaften (Schepens *et al.*, 2011; Wagener *et al.*, 2001).

## 1.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von physiologisch relevanten Mengen an Häm-Eisen (0,25 µmol Häm/g Diät) in Bezug auf eine potenzielle Darmkrebsentstehung und/oder -promotion untersucht werden. Hierzu soll eine Diät mit Hämin, der kommerziell erhältlichen Form von Häm-Eisen, oder eine Eisencitratdiät als Kontrolle Mäusen gefüttert werden. Zur genaueren Analyse der KRK-vermittelten Mechanismen ist vorgesehen, zusätzlich zu wildtypischen (WT) C57BL/6 Mäusen auch MGMT-reparaturdefekte Mäuse (MGMT<sup>-/-</sup>) zu verwenden. Dadurch soll die Beteiligung der MGMT-Reparatur v.a. in Bezug auf Häm-Eisen-induzierte NOCs und deren potenzielle DNA-Schäden analysiert werden. Neben der Häm-Eisen-vermittelten DNA-Schädigung im Kolonepithel (γH2AX, O<sup>6</sup>-MeG) ist geplant, die Proliferation, Bildung fäkaler NOCs und Apoptose *in vivo* sowie die fäkale Zytotoxizität *in vitro* zu untersuchen. Dazu sollen Kolonepithelzellen (HCEC, HCT116) und isolierte intestinale Kryptorganoide verwendet werden. Die Proliferationsrate innerhalb des Kolonepithels nach einer Häm-Eisen-angereicherten Diät wird immunhistochemisch durch eine PCNA-Färbung untersucht. Des Weiteren soll der Einfluss der physiologisch relevanten Häm-Eisenkonzentrationen auf den Apoptose-vermittelten Zelltod (TUNEL-Assay, Caspase-3-Spaltung) bestimmt werden. Die Häm-Eisen-bedingten makroskopischen Veränderungen der Kolonmukosa und die Bewertung einer Kolitis über den MEICS werden mithilfe einer nicht-invasiven Mini-Endoskopie an festen Tagen während eines Langzeitexperiments (162 Tage) an narkotisierten Mäusen bestimmt. Bestätigend dazu soll anhand immunhistochemisch-basierter Methoden die Häm-Eisen-vermittelte Induktion von Entzündungsparametern (F4-80, CD3, COX-2, pSTAT3) im Kolonepithel nach 21 Tagen Diät analysiert werden. Eine genaue Charakterisierung der Häm-Eisen-vermittelten Beeinflussung der intestinalen Immunzellpopulationen innerhalb der IEL und LPL wird durch FACS-basierte Analysen nach 21-tägiger Fütterung erfolgen. Zur Beteiligung des intestinalen Mikrobioms nach Häm-Eisen ist vorgesehen, in wildtypischen Mäusen mithilfe von 16S rRNA-Analysen die Zusammensetzung des Mikrobioms zu unterschiedlichen Zeitpunkten über eine Versuchsdauer von maximal 162 Tagen zu bestimmen. Abschließend wird das Potenzial von diätischem Häm-Eisen bezüglich einer kolorektalen Tumorinitiation in Abhängigkeit des MGMT-Status bestimmt. Hierzu soll die Bildung der Tumore sowie deren Größe mithilfe der Mini-Endoskopie erfasst werden. Die tumorpromovierenden Eigenschaften von Häm-Eisen werden in WT Mäusen nach initialer *i.p.* AOM-Injektion (15 mg/kg KG) mit anschließender Langzeitfütterung ebenfalls endoskopisch ermittelt. Histopathologische Untersuchungen der H&E-gefärbten Kolonabschnitte sollen zur weiteren Charakterisierung herangezogen werden.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

*Tabelle 4: Geräte*

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	- Vacusafe, IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Autoklav	- VX-150, Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
Automatisiertes Mikroskop	- Nanozoomer Serie, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
ChemiDoc™ Touch Imaging System	- Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Dampfgarer	- Braun GmbH, Kronberg, Deutschland
Digital pH-Meter	- Typ PH525, WTW, Weilheim, Deutschland - Calimatic 761, Knick elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Dotblot-Kammer/Slotblot-Kammer	- Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Durchflusszytometer	- FACS Canto II, Becton Dickinson, New Jersey, USA
Eismaschine	- AF 30, Scotman Ice Srl, Milan, Italy - Ziegra, Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	- Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer, horizontal	- Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Folienschweißgerät	- Severin, Sundern, Deutschland
gentleMACS™ Dissoziator	- Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Gewebeeinbettstation Sakura Tissue Tek TEC	- Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat Sakura Tissue Tek VIP	- Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland
Hemavet, Hematology System	- Drew Scientific Inc., Florida, USA
Inkubator Heracell Vios 250i	- Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland - Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Kühlzentrifuge 5424R	- Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborofen/Trockenschrank	- Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Laser-Scanning Mikroskop LSM 710	- Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer Ikamag	- Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mikroskop Primo Vert, Leica DMI1	- Zeiss, Jena, Deutschland - Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer	- Tecan, Männedorf, Schweiz

Sunrise, Spectramax 384 Plus	- Molecular Devices, San Jose, USA
Mikrotom HYAX M25, RM 2125 RT	- Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland - Leica, Wetzlar, Deutschland
Mini-Endoskopie System COLOVIEW® Pro	- KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mini-Tischzentrifuge Spectrafuge, uniFuge2	- Labnet, Woodbridge, USA - Lab Logistics Group GmbH, Labware, Meckenheim, Deutschland
Multikanalpipette	- Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Thermo Cycler T100	- Bio-Rad, München, Deutschland
Pipetten	- Gilson Inc., Middleton, USA - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	- IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Qubit Fluorometer	- Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Rotator SB3 Stuart	- Cole-Parmer Lab Equipment, Stone, Staffordshire, UK
Schwingmühle MM400	- Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Sonifizier-Gerät Cell Disruptor B15, Sonifier 250	- Branson Ultrasonics, Danbury, USA - Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Spannungsquelle Power Pac basic, Power Pac HC	- Bio-Rad, München, Deutschland - Bio-Rad, München, Deutschland
Spektrophotometer Nanodrop ND2000	- Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, Deutschland
Sterilbank Laminar BDK 5.13B	- IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Sterilbank MSC-Advantage1.8	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Thermomixer Comfort	- Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Detektor InGenius	- Syngene, Cambridge, UK
Vakuumpumpe	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Vortexer	- uniTexer1, Lab Logistics Group GmbH, Labware, Meckenheim, Deutschland - Genie, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage TE 4101, A200S, XP205 delta range	- Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland - Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland - Mettler Toledo, Columbus, USA
Wet-Blot System Mini Trans-Blot® Cell	- Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

## 2.2 Materialien

Tabelle 5: Materialien

Material	Hersteller
15 ml- und 50 ml-Röhrchen	- Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar PCR-Reaktionsgefäße 0.5 ml	- Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Corneregel Korneagel	- Dr. Gerhard Mann chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland
Deckgläschen	- Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entsorgungsbeutel	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cell strainer/Zellsieb 70 µm/100 µm	- Corning, Inc., New York, USA - Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland - Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Fettstift DAKO Pen	- DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Fettstift Super PAP Pen, Liquidblocker	- Daido Sangyo Co.Ltd., Tokyo, Japan
gentleMACS™ Gefäß	- Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Gewebeeinbettungskassetten	- Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glaswaren	- Schott, Mainz, Deutschland
Injektionsnadeln	- Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Injektionsspritzen	- B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Lanzetten Omnican Lance Soft	- B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Microvette 200 Trikalium EDTA	- Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Neubauer Zählkammer	- Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nylonmembran (Hybond-N+)	- GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	- Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, Deutschland
Objektträger	- Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Pipettenspitzen	- Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Protran Nitrozellulose Membran 0,2 µm	- GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Protran Pure Nitrocellulose Membran	- PerkinElmer Technologies GmbH & Co. KG, Walluf, Deutschland
Röntgenfilme Cronix 5	- AGFA Health Care, Bonn, Deutschland

Safe-Lock Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	- Eppendorf, München, Deutschland
Unterlage mit Zellstoff	- Paul Hartmann Ltd., Heywood/Lancashire, UK
Whatman 3MM Filterpapier	- GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Whatman Zellulose Filterpapier	- Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol-resistenter Marker	- Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturmaterialien (10 cm-Schalen, 96-Well-Platten)	- Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

## 2.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 6: Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie/kommerzielle Lösung	Hersteller
Agencourt AMPure XP Beads	- Beckman Coulter, Indianapolis, USA
Ammoniumacetat	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa Reinstwasser (für Injektionslösungen)	- Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Azoxymethan (AOM)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
B27 Supplement	- Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	- AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Cosmic calf serum HyClone	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
DAKO Protein Blockierlösung	- DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland
DAKO Target Retrieval Solution	- DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland
Deoxyribonuklease (DNase), RNase-frei	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM mit GlutaMAX	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM/F12	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF (human) für HCEC	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF (murin) für Kryptorganoide	- PeproTech EC Ltd., London, UK
Eisentrichlorid (FeCl <sub>3</sub> )	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol (EtOH)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Gentamycin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Goat Normal Serum (Ziegenserum)	- Invitrogen, Darmstadt
Hämin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrokortison	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Insulin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung (0,9 %)	- B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin (Ketavet, 100 mg/ml)	- Pharmica GmbH, Berlin, Deutschland
Kodak GBX Entwickler	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Kodak GBX Fixierer	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Luminol	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Matrigel, <i>basement membrane matrix growth factor reduced</i>	- Corning, Inc., New York, USA
Medium M199	- Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Methanol (MeOH)	- Merck, Darmstadt, Deutschland
N2 Supplement	- Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
N-Acetylcystein (NAC)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholate	- AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Natriumfluorid (NaF)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumselenit	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
NEBNext UltraQ5 Master Mix	- New England Biolabs, Ipswich, USA
Noggin, murin	- PeproTech EC Ltd., London, UK
Nonidet P-40 (NP-40)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Nystatin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
O <sup>6</sup> -Benzylguanin (O <sup>6</sup> -BG)	- Biozol Diagnostica GmbH, Eching, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
p-Cumarsäure	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Percoll-Lösung	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	- Dulbecco Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ponceau S	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete, EDTA-frei	- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ribonuklease A (RNase A), DNase- und Protease-frei	- Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Roti-Histofix 4 %, Phosphatgepuffertes Formaldehyd (pH 7)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
R-Spondin-1 (human)	- PeproTech EC Ltd., London, UK
Salzsäure 37% (HCl)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spezialfutter für Mäuse	- Altromin Spezialfutter GmbH, Lage Deutschland
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland



TO-PRO-3	- Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Transferrin (human)	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	- AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield Eindeckmedium mit Dapi	- Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Western Lightning Enhanced Luminol Reagent Plus (ECL)	- PerkinElmer, Waltham, USA
Western Lightning Oxidizing Reagent Plus (ECL)	- PerkinElmer, Waltham, USA
Xylazin (Rompun 2 %, 20 mg/ml)	- Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Xylol (Isomerengemisch)	- VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 7: Primärantikörper**

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
Anti-CD3, monoklonal Ratte	MCA500A488	AbD Serotec MCA, Kidlington, UK
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 3 (Asp175), polyklonal Kaninchen	#9661	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts USA
Anti-COX-2, monoklonal Maus	610204	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, USA
Anti-Erk2, monoklonal Maus	sc-1647	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-F4/80, monoklonal Ratte	BM4007	OriGene Europe, Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Anti-HO-1, polyklonal Kaninchen	GTX101147	GeneTex, Inc., Irvine, California, USA
Anti-Hsp90 (C45G5), monoklonal Kaninchen	# 4877	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts USA
Anti-O <sup>6</sup> MeG, monoklonal Maus	SQX-SQM003.1	Axxora, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale (NY), USA
Anti-p53 (1C12), monoklonal Maus	#2524	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts USA
Anti-PCNA, monoklonal Maus	sc-56	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

Anti-phospho-stat3 (T705), polyklonal Kaninchen	#9145	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts USA
Anti-γH2AX, polyklonal Kaninchen	ab11174	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
Ziege-anti-Maus-Alexa-Fluor 488	A11001	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ziege-anti-Maus-HRP (IgGκ-Bindeprotein)	sc-516102	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Ziege-anti-Maus-HRP (IgG)	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-Fluor 488	A11008	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Ziege-anti-Ratte-Cy3	112-165-167	Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, USA

Tabelle 9: Antikörperliste für IEL/LPL

Antikörper	Verdünnung	Artikelnr.	Zellpopulation	Hersteller
Anti-CD11b-APC/Cy7	1:200	101226	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD11c-PeCy7	1:100	25-0114	Dendritische Zellen	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Anti-CD161-APC/Cy7	1:1000	108724	natürliche Killer-(T-) Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD206-FITC	1:150	141704	M2-Makrophagen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD25-APC	1:200	557192	regulatorische T-Zellen	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-CD45-V510	1:200	103138	Lymphozyten	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD4-APC	1:200	100412	CD4 T-Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD4-FITC	1:200	100406	CD4 T-Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-CD86-Biotin	1:200 (SA-PE)	553690	aktivierte Zellen	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-CD8a-PE/Cy7	1:200	100722	CD8 T-Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA

Anti-F4/80 APC	1:75	123116	Makrophagen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-Gr1 V450	1:100	560454 560453	neutrophile Granulozyten	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-Ly-6G-PE	1:200 SA-PE 1:200	127608	neutrophile Granulozyten	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-Maus- CD45R/B220- PerCP	1:200	103234	B-Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-TCR $\beta$ -Biotin	SA-PE/Cy7 1:100	553169	$\alpha\beta$ T-Zellen	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-TCR $\beta$ -FITC	1:100	1009205	$\alpha\beta$ T-Zellen	BioLegend, Kalifornien, USA
Anti-TCR $\gamma\delta$ -PE	1:200	12-5711	$\gamma\delta$ T-Zellen	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Streptavidin-PE (SA-PE)	1:200	554061		Becton Dickinson, New Jersey, USA
Streptavidin- PE/Cy7 (SA- PE/Cy7)	1:200	25-4317		Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Viab-APC/Cy7	1:1000	65-0865	Lebendzell- Marker	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland

## 2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x Natriumcitratpuffer (IHC)	10 mM Natriumcitrat 0,05 % Tween 20 pH 6
10x SDS Laufpuffer/ <i>Blotting</i> -Puffer	200 mM Tris 1,54 M Glycin
10x TBS, pH 7,6 (HCl)	100 mM Tris 1,5 M NaCl
1x <i>Blotting</i> -Puffer	200 ml 10x <i>Blotting</i> -Puffer 400 ml Methanol ad 2000 ml ddH <sub>2</sub> O
1x SDS-Laufpuffer	200 ml 10x SDS-Laufpuffer 20 ml SDS (10 %) ad 2000 ml ddH <sub>2</sub> O
5x SDS-Ladepuffer/Lämmli	200 mM Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerin 0,08 % Bromphenolblau 4 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Ammoniumacetat-Puffer	2 M NH <sub>4</sub> Ac

Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Bradfordlösung	10 mg Coomassie Brilliant Blue G250 5 ml EtOH 10 ml Phosphorsäure (85 %) ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O
ECL Puffer A (selbsthergestellt)	4,4 ml ddH <sub>2</sub> O 500 µl 1 M Tris-HCl, pH 9 50 µl 250 mM Luminol 22 µl 90 mM Cumarsäure
ECL Puffer B (selbsthergestellt)	4,5 ml ddH <sub>2</sub> O 500 µl 1 M Tris-HCl, pH 9 50 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Eosin (wässrig)	1 g Eosin (Y) 100 ml ddH <sub>2</sub> O 1-2 Tropfen Eisessig pH 4-6
Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierungspuffer (FACS-Puffer, LPL/IEL)	1x PBS 2 % FCS
loTE-Puffer	3 mM Tris 0,2 mM EDTA pH 8
Mastermix für DNA-Isolation (8:1)	35 ml 100 % EtOH 5 ml 7,5 M NH <sub>4</sub> Ac
Narkose	12 mg/ml Ketamin 1,6 mg/ml Xylazin Isotonische Kochsalzlösung (0.9 %)
Percollgradient 40 % (LPL/IEL)	42,01 ml Percoll-Separationslösung (Dichte 1,124 g/l) 57,99 ml 1x PBS
Percollgradient 80 % (LPL/IEL)	79,83 ml Percoll-Separationslösung (Dichte 1,124 g/l) 20,17 ml 1x PBS
Ponceau S Lösung	5 % Essigsäure 0,1 % Ponceau S
RIPA Puffer (Gewebe)	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl 0,1 % SDS 1 % Na-Deoxycholate 1 % NP-40 0,2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 2 mM EDTA 50 mM NaF 1 mM PMSF 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail
Saures Mayer's Hämalun	1 g Hämatoxylin 0,2 g NaJO <sub>3</sub> 50 g Kaliumaluminiumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
Strip-Puffer A	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl

	pH 2,0
Strip-Puffer B	0,5 M Tris pH 11,0
<i>Tail</i> -Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.5 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl
TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS-T	1x TBS 0,1 % Tween 20
TE-Puffer (pH 8 oder pH 9)	500 mM Tris 20 mM EDTA 10 mM NaCl 0,1 % Triton X-100
Verdauulösung (LPL/IEL)	1x PBS 0,5 mg/ml Collagenase D 0,5 mg/ml DNase I 0,5 U/ml Dispase II 5 % FCS
Vorverdauulösung (LPL/IEL)	1x PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , phenolrotfrei) 10 mM HEPES 5 mM EDTA 5 % FCS

## 2.6 Mediumzusammensetzung für Kryptorganoide

*Tabelle 11: Medien und Zusätze für Kryptorganoide*

Mediumzusatz	Endkonzentration
B27 Supplement (50x)	1x
BSA	0,1 %
murines EGF	100 ng/ml
HEPES	10 mM
L-Glutamin	2 mM
N2 Supplement (100x)	1x
N-Acetylcystein	1 mM
murines Noggin	100 ng/ml
Nystatin	20 µg/ml
Penicillin	100 U/ml
rekombinates h R-Spondin-1	500 ng/ml
Streptomycin	100 µg/ml

## 2.7 Mediumzusammensetzung für HCEC

*Tabelle 12: Medien und Zusätze für HCEC*

Mediumzusatz	Endkonzentration
<i>Cosmic calf serum</i> HyClone	2 %
EGF	25 ng/ml
Gentamycin	50 µg/ml

Hydrokortison	1 µg/ml
Insulin	10 µg/ml
Medium M199	20 %
Natriumselenit	5 nM
Transferrin (human)	2 µg/ml

## 2.8 Kits

Tabelle 13: Kits

Kit	Hersteller
<i>CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega Corporation, Madison, USA
<i>In-situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL)</i>	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
PSP Spin Stool DNA Plus Kit	Stratec Molecular GmbH, Berlin, Deutschland
Qubit Fluorometer dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

## 2.9 Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurden wildtypische (WT) und MGMT-reparaturdefekte Mäuse (MGMT<sup>-/-</sup>) mit einem C57BL/6J OlaHsd genetischen Hintergrund verwendet (Glassner *et al.*, 1999). Die WT Mäuse wurden aus eigener Zucht bezogen oder kommerziell von der Firma Envigo (C57BL/6J OlaHsd) erworben. Die MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von [REDACTED]

[REDACTED] bereitgestellt und in eigener Zucht der TARC in Mainz und VTH am BFS in Gießen gehalten. Zu Beginn einer Versuchsreihe für Langzeitexperimente waren die Mäuse zwischen 8 und 11 Wochen und für Kurzzeitexperimente max. 18 Wochen alt. Die Versuchstiere wurden in Gruppen mit max. 3 Tieren in Typ II kurz und Typ II lang Käfigen gehalten. Lichtzyklus, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden nach GV-Solas-Empfehlungen für Nager eingehalten. Die Haltungs- und Zuchtbedingungen erfolgten gemäß der TARC nach §11 (Kreisverwaltung Mainz-Bingen, Aktenzeichen 41a/177-5865-§11 ZVTE). Die Versuchstierhaltung erfolgte gemäß des sogenannten OHB- (optimale hygienische Bedingungen) Hygienekonzepts mit regelmäßigen Testungen auf die Präsenz pathogener Mikroorganismen, entsprechend der FELASA-Empfehlungen. Der MGMT-defekte Genotyp wurde mithilfe einer Genotypisierungs-PCR aus Ohr- bzw. Schwanzspitzen-Biopsien kontrolliert (3.4).

## 2.10 Software

**Tabelle 14: verwendete Software**

Name	Verwendung	Hersteller/Ursprung
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe Systems, Kalifornien, USA
ChemDraw Ultra	chemisches Zeichnen	PerkinElmer Technologies GmbH & Co. KG, Walluf, Deutschland
EndNote X6	Referenzverwaltung	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo887	FACS Auswertungen	<a href="https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads">https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads</a>
GraphPad Prism 6/7/8	Diagramme, statistische Auswertung	Graph Pad Software, La Jolla, USA
ImageJ	Auswertung von Mikroskopieaufnahmen, Bearbeitung	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a> Wayne Rasband
ImageLab	Auswertung von Western-Blots, Bearbeitung	Bio-Rad, München, Deutschland
LaserEZ 3.4.0	Durchlichtmikroskop-Aufnahmen	Leica Microsystems, Schweiz
MicrobiomeAnalyst	Mikrobiom-Auswertung	<a href="https://www.microbiomeanalyst.ca/">https://www.microbiomeanalyst.ca/</a>
Microsoft Excel 2016	Rechnung, Auswertung	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Zusammenstellung, Auswertung	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word 2016	Texterstellung	Microsoft Corporation, Washington, USA
NDP.view2	Auswertung (H&E) von Mikroskopie-Aufnahmen	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Usearch10	Mikrobiom-Auswertung	<a href="https://drive5.com/usearch/">https://drive5.com/usearch/</a>
VLC-Player	Auswertung der Koloskopievideos	VideoLan, Paris, Frankreich
Zen 2011	LSM710-Aufnahmen	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

## 2.11 Statistische Tests

Die Tests auf statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit geeigneten statistischen Methoden der Software GraphPad Prism durchgeführt. P-Werte sind durch Sternchen gekennzeichnet: 0,05 (\*); 0,01 (\*\*); 0,001 (\*\*\*); 0,0001 (\*\*\*\*). Für Werte über 0,05 wurde die Nullhypothese nicht abgelehnt und Unterschiede werden als nicht signifikant (ns) gekennzeichnet. Ausreißer wurden mit dem online Ausreißertest *QuickCalcs* von GraphPad Prism ermittelt und für die weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Für die Abbildungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, die Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwertes) angegeben.

Für die durchgeführten Experimente wurde eine Normalverteilung angenommen. Vergleicht man die Mittelwerte von zwei nicht übereinstimmenden Proben (z.B. Häm-Eisen

vs. Eisencitrat), so wurde der ungepaarte *Student's t*-Test verwendet. Mit dem zweiseitigem ANOVA-Test wurde eine Aussage über die statistische Signifikanz beim Vergleich der Genotypen untereinander getroffen.

### 3. Methoden

#### 3.1 Intestinale Organoide

##### 3.1.1 Isolation und Aussaat intestinaler Organoide

Zur Herstellung intestinaler Organoide wurden 6 bis 12 Wochen alte WT Mäuse verwendet. Das Protokoll zur Isolation wurde von [REDACTED] zur Verfügung gestellt (Grabinger *et al.*, 2016). Der Dünndarm wurde distal des Magens und proximal des Blinddarms abgetrennt und bis zur weiteren Verarbeitung in eiskaltem PBS gelagert. Der Darm wurde anschließend longitudinal geschnitten und mit der luminalen Seite nach oben geöffnet. Zur mechanischen Entfernung von Stuhlresten und Villi wurde vorsichtig mit einem Objektträger über die luminale Seite des Dünndarms gestrichen und dieser anschließend in 2 cm große Stücke geschnitten. Danach wurden diese dreimal mit 20 ml kaltem PBS durch energisches Schütteln für mindestens 10 s gewaschen. Die intestinalen Gewebstücke wurden für 30-45 min bei 4 °C in 30 ml PBS mit 2 mM EDTA in einem Überkoprotator inkubiert. Danach wurde der PBS/EDTA-Puffer durch 20 ml kaltes PBS ersetzt und zunächst 4-6-mal vorsichtig geschüttelt. Waren nach mikroskopischer Kontrolle zu wenige Krypten und zu viele Villi enthalten, wurde der Überstand in ein neues Falcon transferiert und die Darmstücke erneut mit 20 ml PBS 10-20-mal energisch geschüttelt. Dieser Schritt kann mehrere Male wiederholt werden, um ein optimales Villi/Krypten-Verhältnis zu erhalten. Bei jeder Wiederholung sollten die Quantität und Intensität des Schüttelns erhöht werden. Die Auswahl der Waschfraktion entscheidet sich nach der besten Villi/Krypten-Rate, d.h. es wird mit der Fraktion weitergearbeitet, in der die meisten intakten Krypten vorhanden sind. Um die darin enthaltenen Villi abzutrennen, wird die entsprechende Waschfraktion durch ein Zellsieb (100 µm) gegeben und die gesiebte, mit Krypten-angereicherte Lösung bei 100 ×g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem PBS aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Zur Einzelzellentfernung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 60 ×g für 3 min und das Pellet wurde in 4-6 ml PBS resuspendiert. Die Kryptenzahl pro 25 µl wurde in einer 96 *Well*-Platte mithilfe eines Mikroskops bestimmt. Hier wurden nur die intakten, tassenförmigen Krypten gezählt. Das Volumen für die benötigte Gesamtanzahl der Krypten (ca. 500 Krypten pro *Well*) wurde bei 100 ×g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und die Krypten vorsichtig in der benötigten Menge Matrigel (7 µl pro 500 Krypten)



resuspendiert. Dieser Schritt erfolgte ausschließlich auf Eis und es wurde stets darauf geachtet, Luftblasen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Polymerisierung des Matrigels bei 37 °C im Inkubator für 15-20 min. Das Kryptenmedium wurde auf Raumtemperatur (RT) erwärmt und mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren (Tabelle 11) versetzt. Auf die polymerisierten Kryptentropfen wurden jeweils 80 µl Kryptenmedium (Tabelle 11) gegeben und die Organoide für 3 Tage in einem luftfeuchtigkeitsgesättigten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> expandiert und ausdifferenziert.

### 3.1.2 Behandlung intestinaler Organoide und Zelltodmessung

Nach 3 Tagen wurden die Organoide mit aufsteigenden Dosen Hämin, der kommerziell erhältlichen Form des Häm-Eisens, mit einem zentralen Fe<sup>3+</sup> und einem Chloridliganden (Abb. 11) oder Eisentrichlorid (FeCl<sub>3</sub>), das als anorganische Eisenkontrolle eingesetzt wurde, behandelt (10, 50, 100 µM) und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Behandlung der intestinalen Organoide erfolgte stets in Triplikaten. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) bestimmt. Bei diesem Assay wird das wasserlösliche MTT durch metabolisch-aktive Zellen reduziert. Pro *Well* wurden 8 µl der MTT-Lösung (500 µg/ml) dazugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das gesamte Medium inklusive MTT-Reagenz wurde entfernt, durch 20 µl einer 2 %-igen SDS-Lösung ersetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde die Platte gelegentlich vorsichtig geschüttelt, um das Matrigel komplett aufzulösen. Das wasserunlösliche Formazan-Produkt wurde durch Zugabe von 80 µl DMSO pro *Well* für 1 h bei 37 °C gelöst und anschließend die Absorption bei 562 nm mittels Mikrotiter-Platten-Analysegerät bestimmt.

### 3.2 Behandlung humaner Kolonepithelzellen und Zelltodmessung

Zur Untersuchung der Häm-Eisen-vermittelten Zytotoxizität auf Kolonzellen wurden humane Kolonepithelzellen (HCEC, 1CT WT) (Roig *et al.*, 2010), die von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die Kultivierung erfolgte, wie in der Literatur beschrieben, in DMEM+GlutaMAX-Medium mit den in Tabelle 12 aufgelisteten Zusätzen (Mimmeler *et al.*, 2016). Die Zellen wurden in luftfeuchtigkeitsgesättigter Umgebung bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 7 % CO kultiviert.

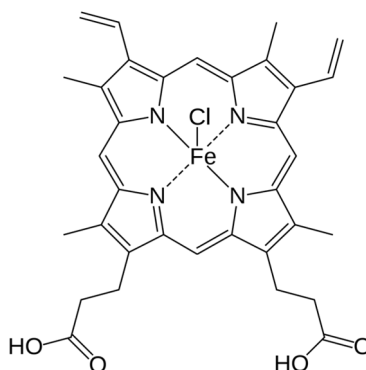
Die Zellen wurden in einer 96-*Well*-Platte in einer Zelldichte von 5×10<sup>3</sup>/*Well* ausgesät und am nächsten Tag mit aufsteigenden Dosen Häm-Eisen (Hämin) bzw. FeCl<sub>3</sub> (jeweils Triplikate) für 72 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mithilfe eines kolorimetrischen MTS-Assay bestimmt. Dabei wird die gelbe MTS-Tetrazolium-Verbindung (3(3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) durch lebende Zellen in ein rotbräunliches, wasserlösliches Formazan-Produkt reduziert. Die Umwandlung des Substrats ist dabei proportional zur metabolischen Aktivität lebender Zellen. Nach 72 h Inkubationszeit wurden 5 µl des MTS-Reagenz in jedes *Well* gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte am *Microplate Reader Sunrise RC TS/TW* bei 490 nm Absorptionsfilter.

Die Absorption nach den Behandlungen wurde prozentual auf die Absorption der Kontrolle normiert und die Kontrolle auf 100 % Zellviabilität gesetzt.

### 3.3 Generierung einer Eisen-balancierten Spezialdiät

Für die *in vivo* Fütterungsexperimente wurde eine Eisen-balancierte Spezialdiät von der Firma Atromin Spezialfutter GmbH hergestellt. Zu diesem Zweck wurde zunächst Hämin, die kommerziell erhältliche Form des Häm-Eisens, erworben und zur Weiterverarbeitung an die Firma Altromin gesendet. Hämin ist die oxidierte Form des Häms, welche zusätzlich einen Chlorliganden enthält und standardmäßig als Häm-Eisen-Quelle eingesetzt wird (de Vogel *et al.*, 2008; Pierre *et al.*, 2003; Sesink *et al.*, 1999). Die Strukturformel von Hämin ist in Abb. 11 abgebildet.



**Abbildung 11: Strukturformel Hämin.**  
Dargestellt mit ChemDraw Ultra 12.0.

Die genaue Zusammensetzung der Spezialdiäten sind der Tabelle 28 im Anhang zu entnehmen. Die Diät enthält wenig Calcium (20 µmol/g Diät) und die Häminkonzentration wurde auf ca. 0,25 µmol/g Diät eingestellt. Dieser Häm-Gehalt der Diät korreliert mit dem täglichen Verzehr von ca. 200 g rotem Fleisch pro Tag. Der niedrige Calciumgehalt ist notwendig, da Calcium in hohen Mengen Häm präzipitiert und somit dessen Wirkung hemmen kann (Pierre *et al.*, 2003). Eine Diät, die mit einer des Häm-Eisengehalts vergleichbaren Menge Eisencitrat versetzt wurde, diente als Kontrolldiät. Der Gesamteisengehalt beider Diäten ist auf ca. 17 mg/kg Diät ausbalanciert (Tabelle 28 siehe Anhang). Die Lagerung der Futterpellets erfolgte bei 4 °C.

### 3.4 Genotypisierung transgener Tiere

Für die Genotypisierung der MGMT-reparaturdefizienten Mäuse (MGMT<sup>-/-</sup>) aus eigener Zucht wurde genetisches Material aus Ohrstanzen oder Schwanzspitzen verwendet. Hierzu wurde das Gewebe über Nacht in 40 µl *Tail*-Puffer mit 2,5 mg/ml Proteinase K bei 56 °C und 400 rpm in einem Thermoschüttler verdaut. Am nächsten Tag wurden 300 µl ddH<sub>2</sub>O dazugegeben und die Proteinase K bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand für die PCR (*Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) verwendet.

Die PCR wird für die exponentielle Amplifikation von genetischem Material verwendet. Hierzu synthetisiert die DNA-Polymerase Kopien eines komplementären DNA-Strangs als sog. DNA-*Template*. Als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen kleine (18-30 bp) Oligonukleotide, auch Primer genannt. Diese lagern sich *upstream* an die komplementäre Sequenz des DNA-Templates. Zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen wird zunächst die native, doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt. Nun liegt die DNA als Einzelstrang vor. Im anschließenden *Annealing*-Schritt lagern sich die Primer an das DNA-*Template* an. Im darauffolgenden Elongationsschritt findet die Synthese des komplementären DNA-Stranges statt. Der verwendete PCR Mastermix enthält alle benötigten Komponenten. Die jeweiligen Primer, ddH<sub>2</sub>O und die *Template*-DNA wurden zusätzlich hinzugefügt (Tabelle 16). Die verwendeten Primer zur Analyse der Zielsequenzen sind in Tabelle 15 und das verwendete PCR-Programm des *Thermocyclers* ist in Tabelle 17 aufgelistet.

**Tabelle 15: Genotypisierungsprimer**

Genotyp	Primer	Primersequenz
<b>MGMT</b> Wildtypisches Allel: 542 bp (M-A, M-C) Mutiertes Allel: 409 bp (M-A, M-B)	Primer M-A	5'-GGCATCTTCCTCCTAAACCTGGA-3'
	Primer M-B	5'-GGTGGGATTAGATAAATGCCTGCT-3'
	Primer M-C	5'-CCCCAGGACACTTGCAGCTCT-3'

**Tabelle 16: PCR-Komponenten für MGMT-Genotypisierung**

Komponente	Volumen [µl]
Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red	7
Primer (jeweils)	1
ddH <sub>2</sub> O	4
DNA-Template	1
Gesamtvolumen	15

Tabelle 17: PCR Programm für MGMT-Genotypisierung

Deckeltemperatur	105 °C	
Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	4 min
2	94 °C	1 min
3	62 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	GOTO 2 (30 Zyklen)	
6	72 °C	8 min
7	4 °C	∞

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (7,5 µl Ethidiumbromid in 100 ml Gel) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In einem elektrischen Feld wandert die negativgeladene DNA in Richtung der Anode, wobei kleine Fragmente schneller durch die Gelmatrix wandern als große Fragmente. Als Größenreferenz wurde 5 µl eines DNA-Größenmarkers (100 bp Marker) zusätzlich in eine Tasche des Gels gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben erfolgte 1 h bei 100 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer in TBE-Puffer. Anschließend wurden die PCR-Produkte, in die Ethidiumbromid interkaliert, mithilfe von UV-Licht visualisiert und deren Größe anhand des DNA-Größenmarkers verglichen und ausgewertet.

### 3.5 Vorbereitung von Azoxymethan für eine *intraperitoneale* Injektion

Die wildtypischen Mäuse wurden vor Versuchsbeginn gruppiert und mittels Ohrmarkierung identifiziert. Zur Induktion eines DNA-Schadens im Kolon wurde Azoxymethan (AOM) verwendet. AOM wird über die Leber verstoffwechselt und gelangt dann u.a. über die Galle in den Darm, wo es alkylierende DNA-Schäden wie *N*7-MeG, *N*3-MeA und *O*<sup>6</sup>-MeG induziert. Das kolonotrope AOM ist eine etablierte Substanz zur Initiierung von Darmkrebs in Nagern und wird häufig zur Untersuchung der Kolonkanzerogenese verwendet (Wirtz *et al.*, 2010).

Am Tag der AOM-Injektion wurden die Mäuse gewogen, die benötigte Menge AOM berechnet und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 400 µl angepasst. Die AOM-Stock-Lösung wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml bei -80 °C gelagert. Vor jeder Injektion wurde der AOM-Stock auf Eis aufgetaut, um dessen Hydrolyse zu verhindern. Die AOM-Stock-Lösung wurde anschließend mit sterilem 10x PBS und ddH<sub>2</sub>O angesetzt und eine 1 mg/ml AOM Arbeitslösung hergestellt. Das benötigte AOM-Volumen für jedes Tier wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits die berechnete Menge 1x PBS enthalten war. Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert und bis zur *intraperitonealen* (*i.p.*) Injektion auf Eis gelagert. Die Arbeiten mit AOM wurden stets unter sterilen

Bedingungen durchgeführt und auf das Tragen von zusätzlicher Schutzkleidung wurde geachtet. Um einen Zerfall von AOM zu verhindern, wurden die Lösungen für max. 15 Tiere angesetzt. In der Kontrollgruppe wurden die Tiere mit 400 µl sterilem 1x PBS *i.p.* injiziert.

### 3.6 Versuchsaufbau der Eisen-balancierten Diäten

Die Tiere wurden sowohl aus eigener Tierzucht bezogen, als auch kommerziell bei Envigo erworben. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Mäuse zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 18 Wochen alt und die Geschlechter gleich verteilt waren. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse gruppiert, mittels Ohrlöchern markiert und gewogen. Anschließend wurden die Mäuse mit der entsprechenden Spezialdiät für 21 bzw. 162 Tage gefüttert.

#### 3.6.1 Kurzzeitexperimente

Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse einige Tage akklimatisiert. Anschließend wurden sie, wie unter 3.6 beschrieben, vorbehandelt und 21 Tage mit der entsprechenden Spezialdiät gefüttert. Das Gewicht der Mäuse wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und dokumentiert. An Tag 21 wurden die Mäuse erneut gewogen und mittels Ketamin/Xylazin-Narkose-Lösung (7 µl/g Körpergewicht) durch *i.p.* Gabe narkotisiert und, wie in 3.8 beschrieben, mittels Mini-Endoskop koloskopiert. Zusätzlich wurde an den narkotisierten Mäusen eine Blutentnahme durchgeführt (3.7). Anschließend wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Organe wie in 3.9 beschrieben entnommen und asserviert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 12 dargestellt.



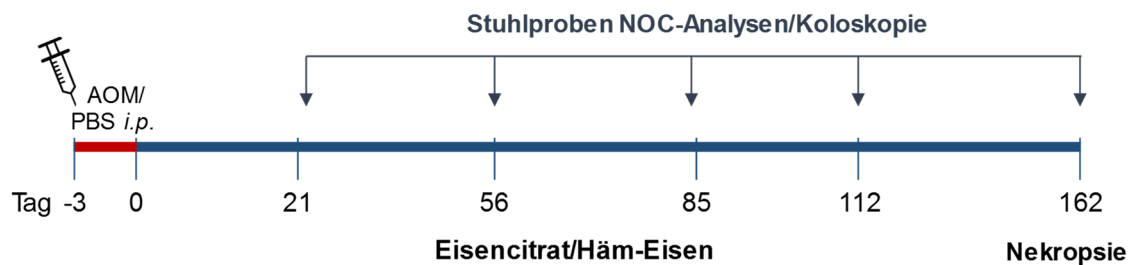
**Abbildung 12: Versuchsaufbau der Kurzzeitexperimente.**

Die Mäuse erhielten für 21 Tage eine Eisencitrat- oder Häm-Eisen-haltige Diät. An Tag 21 wurden die Mäuse narkotisiert und koloskopiert. Es wurde Blut abgenommen und die Mäuse anschließend nekropsiert.

#### 3.6.2 Langzeitexperimente

Für die Langzeitexperimente wurden die Mäuse, wie in 3.5 beschrieben, vorbehandelt und entweder mit PBS (WT und MGMT<sup>-/-</sup>) oder mit 15 mg/kg Körpergewicht (KG) AOM (nur WT) *i.p.* injiziert. Nach 72 h erhielten die Mäuse bis zum Versuchsende das entsprechende Spezialfutter mit Eisencitrat oder Häm-Eisen. Das Gewicht der Mäuse wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und dokumentiert. Die Mäuse wurden an Tag 21, 56, 85, 112 und 162 gewogen, mit entsprechender Menge Ketamin/Xylazin (7 µl/g KG) *i.p.*

narkotisiert und koloskopiert (3.8). Im Versuchsschema mit vorheriger PBS-Injektion wurden an Tag 21, 56, 85, 112 und 162 Stuhlproben gesammelt und bis zur Analyse der fäkalen NOC und Zytotoxizität bei -80 °C gelagert (3.17). An Tag 162 wurden die Mäuse narkotisiert und koloskopiert. Die Mäuse wurden anschließend durch zervikale Dislokation getötet und das Gewebe, wie in Abschnitt 3.9 beschrieben, geerntet. Der exakte Versuchsaufbau ist in Abb. 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Versuchsaufbau der Langzeitexperimente.**

Vor Versuchsbeginn wurde den Mäusen PBS oder AOM (15 mg/kg KG) injiziert und 72 h nach der Injektion mit einer Eisencitrat- oder Häm-Eisen-haltigen Diät für 162 Tage gefüttert. An Tag 21, 56, 85, 112, 162 wurden die Mäuse narkotisiert, koloskopiert und Stuhlproben zur NOC-Analyse gesammelt.

### 3.7 Blutentnahme narkotisierter Mäuse und Blutanalyse

Die Blutentnahme wurde an Tag 21 unmittelbar nach der Koloskopie an der narkotisierten Maus durchgeführt. Dazu wurde die *Vena facialis* mithilfe einer Lanzette punktiert und 100-200 µl Blut in eine EDTA-Trikalium-beschichtete Microvette überführt und mehrfach geschüttelt. Anschließend wurde das Blut für die Blutropfenmethode (3.7.1) verwendet.

#### 3.7.1 Blutropfenmethode

Zur Analyse von DNA-Schäden in peripheren Blutzellen wurde die sogenannte Blutropfenmethode (*Blood Drop Method*, BDM) durchgeführt (Heylmann *et al.*, 2016). Bei dieser Methode werden für die Analyse von DNA-Schäden nur geringste Blutmengen benötigt.

Dazu wurde aus einem Tropfen peripheren Blutes (3.7) ein Blutausschlag angefertigt und nach kurzer Trockenzeit ein Areal auf dem Objektträger mithilfe eines Fettstifts umkreist. Die Zellen wurden in Methanol-Acetat (7:3) 6 min bei -20 °C permeabilisiert und nach einem kurzen PBS-Waschschritt mit 2,5 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Nach intensivem Waschen (3x 5 min) mit PBS wurden die Zellen in 10 % *Goat*-Serum in PBS für 1 h in einer feuchten Kammer blockiert. Nach kurzem Waschen mit PBS erfolgte die Primärantikörper-Färbung von γH2AX (1:1000) und dem Oberflächenmarker für T-Zellen *cluster of differentiation 3* (CD3) (1:500) in 1 % BSA/PBS über Nacht bei 4 °C. Nach wiederholtem Waschen (3x 5 Min) mit PBS wurden die Zellen 2 h mit den Sekundärantikörpern Ziege-

anti-Kaninchen-Alexa-488 (1:300) und Ziege-anti-Ratte-Cy3 (1:500) in 1 % BSA/PBS bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS (3x 5 min) wurden die Zellkerne mit TO-PRO-3 (1:1000 in PBS) für 15 min bei RT angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit *Vectashield*-Eindeckmedium eingebettet und schließlich mit Nagellack fixiert. Die Analyse der Immunfluoreszenz-Signale erfolgte durch konfokale Mikroskopie am LSM-710. Es wurden je Probe 30-50 CD3-positive T-Zellen ausgezählt und deren DNA-Schäden als  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle mit der ImageJ-Software bestimmt.

### 3.8 Koloskopie narkotisierter Mäuse

Vor Gebrauch des Koloskops wurde das gesamte System überprüft und die Kameraoptik mit 70 %-igem EtOH gereinigt. Der Luftstrom wurde in ddH<sub>2</sub>O getestet und mithilfe des Reglers auf eine schwache Intensität eingestellt. Hierbei ist zu beachten, dass ein zu starker Luftstrom den gastrointestinalen Trakt der Maus verletzen kann. Die Koloskopie wurde stets an Ketamin/Xylazin-narkotisierten (7  $\mu$ l/g KG) Mäusen durchgeführt, deren Narkosetiefe anhand ihrer Reflexe bestimmt wurde. Zur Vermeidung der Kornea-Austrocknung wurde ein Korneagel aufgetragen. Stuhlreste wurden stets vor Beginn mittels Darmspülung mit 1x PBS entfernt. Die Kameraoptik des Mini-Endoskops wurde anschließend vorsichtig in das Rektum der narkotisierten Maus bis zur Flexur des Kolons eingeführt. Die endoskopischen Videos wurden direkt auf einen Computer übertragen. Die Auswertung der Videos erfolgte mithilfe des *VLC-Players* und die Darmentzündung wurde durch den sogenannten *murin endoscopic index of colitis severity* (MEICS) bestimmt (3.8.1). Auf diese Weise wurden auch der Tumorscore und die Tumoranzahl bestimmt (3.8.2). Nach der Untersuchung wurden die Mäuse zurück in die entsprechenden Käfige transferiert. Die Aufwachphase erfolgte stets unter Beobachtung.

#### 3.8.1 Bewertung der Koloninflammation (Kolitisscore) mit MEICS

Der Schweregrad der Kolitis wurde mithilfe des sogenannten MEICs, nach Becker bestimmt (Becker *et al.*, 2006). Die Bewertung der Koloninflammation hängt von fünf verschiedenen Parametern ab: der Transluzenz der Kolonwand, den Änderungen des vaskulären Musters, dem Vorhandensein von Fibrin, der mukosalen Granularität und der Stuhlkonsistenz (Abb. 14). Der MEICS setzt sich aus der Summe dieser Faktoren zusammen. Die Mäuse wurden zur Bestimmung des MEICs, wie in 3.8 beschrieben, narkotisiert und koloskopiert.



**A)**

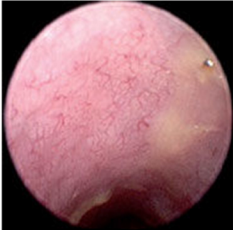
*Murine endoscopic index of colitis severity (MEICS)*

	0	1	2	3	Total
Verdickung des Kolons	transparent	moderat	ausgeprägt	nicht-transparent	0-3
Veränderungen des vaskulären Musters	normal	moderat	ausgeprägt	blutig	0-3
Sichtbares Fibrin	kein	wenig	ausgeprägt	extrem	0-3
Granularität der Mukosaoberfläche	kein	moderat	ausgeprägt	extrem	0-3
Stuhlkonsistenz	normal + fest	geformt	unförmig	verstreut	0-3


**B)**

insgesamt 0-15


**a**



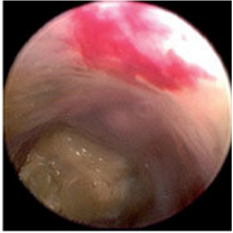
**b**



**c**



**d**








**Abbildung 14: Bestimmungsparameter zur Ermittlung des MEICs und repräsentative Aufnahmen.**

A) Parameter und Bewertungsskala zur Bestimmung der Koloninflammation (MEICS). B) Repräsentative Aufnahmen für bestimmte Veränderungen. a) verändertes vaskuläres Muster, b) verstärkte Granularität, c) vermehrtes Fibrinvorkommen, d) Blutungen und veränderte Stuhlkonsistenz. Modifiziert nach (Becker *et al.*, 2006).

### 3.8.2 Bestimmung des Tumorscores


Für die Bestimmung des Tumorscores erhielten die Mäuse eine Langzeitdiät mit Eisencitrat oder Häm-Eisen und wurden, wie in 3.8 beschrieben, narkotisiert und koloskopiert. Die Tumore wurden gezählt und nach dem Schema von Becker und Kollegen der Größe nach bestimmt (Abb. 15) (Becker *et al.*, 2006).

**A)**


Größe		Wert
gerade erkennbar		1
1/8		2
1/4		3
1/2		4
> 1/2		5

**B)**


**1**




**2**




**3**



**4**



**5**



**Abbildung 15: Endoskopische Bewertung der Tumorentwicklung.**

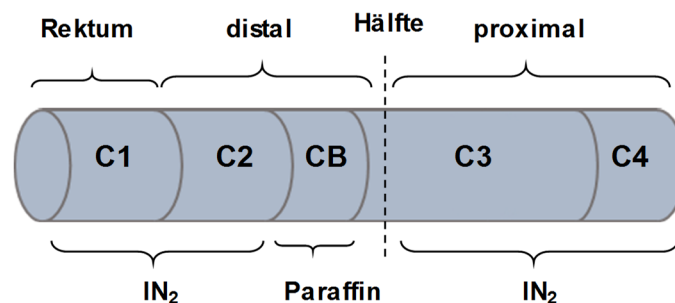
A) Bewertung der Tumorgöße relativ zum Umfang des Kolons. B) Repräsentative endoskopische Aufnahmen von murinen Kolontumoren. Dargestellt sind die Tumorgößen 1 bis 5. Modifiziert nach (Becker *et al.*, 2006).



Der Tumorscore für jedes Tier errechnet sich aus der Anzahl der Tumore summiert mit der Tumorgroße. Hierbei zeigen sich Unterschiede im Tumorscore durch unterschiedliche Tumorprogression, wohingegen die Tumoranzahl die Menge der induzierten Tumore widerspiegelt (Becker *et al.*, 2006).

### 3.9 Entnahme und Aufarbeitung von Organen

Am Versuchsende wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Abdomen geöffnet, mit kaltem PBS gespült und Leber und Kolon entnommen. Die Organe wurden mehrfach mit kaltem PBS ab- und durchgespült, um Blut oder Stuhlreste zu entfernen. Das Kolon wurde unterhalb des Zäkums abgeschnitten und anschließend in 5 Abschnitte geteilt (Abb. 16).



**Abbildung 16: Einteilung des Kolons in verschiedene Abschnitte zur Analyse.**

Abschnitt CB wurde in 4 % Roti-Histofix fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Abschnitte C1-C4 wurden in flüssigem Stickstoff (IN<sub>2</sub>) schockgefroren.

Zur Vorbereitung histologischer Analysen wurde der Kolonabschnitt CB sowie zwei halbe Leberlappen zunächst 6 bis 8 h in 4 % Roti-Histofix inkubiert. Nach Fixierung wurden die Gewebe in Einbettkassetten transferiert, kurz in H<sub>2</sub>O gewässert und in einem automatisierten Gewebeeinfiltrationsautomaten fixiert. Die Fixierung der Gewebe erfolgte nach dem in Tabelle 18 dargestellten Programm.

Tabelle 18: Programm des automatisierten Gewebeinfiltrationsautomaten

Schritt	Lösung	Dauer	Temperatur
1	EtOH 50 %	30 min	40 °C
2	EtOH 70 %	60 min	40 °C
3	EtOH 80 %	60 min	40 °C
4	EtOH 96 %	60 min	40 °C
5	EtOH 96 %	60 min	40 °C
6	EtOH 100 %	60 min	40 °C
7	EtOH 100 %	60 min	40 °C
8	Xylol	60 min	40 °C
9	Xylol	60 min	40 °C
10	Xylol	60 min	40 °C
11	Paraffin	60 min	60 °C
12	Paraffin	60 min	60 °C
13	Paraffin	60 min	60 °C
14	Paraffin	60 min	60 °C

Anschließend wurde das fixierte Gewebe mithilfe einer Gewebeeinbettstation in Paraffin eingebettet und bei RT gelagert. Die Kolonabschnitte C1-C4 und zwei Leberlappen (L1, L2) wurden in flüssigem Stickstoff (IN<sub>2</sub>) schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.10 Nachweis der Eisenaufnahme in murines Kolongewebe mittels ICP-MS/MS

Zur Überprüfung der intestinalen Eisenaufnahme in murines Kolongewebe wurde eine Tandem-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS/MS) verwendet. Für die Analyse des Eisengehaltes wurde der proximale Kolonabschnitt C4 von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet. Die Planung und Durchführung der Analysen zur Eisenaufnahme wurde in Kooperation mit [REDACTED]

[REDACTED] durchgeführt. Für den Mikrowellenaufschluss wurde zur abgewogenen Gewebeprobe je 125 µl Rhodium (10 µg/l), 500 µl konzentrierte HNO<sub>3</sub> (65 %) und 875 µl H<sub>2</sub>O gegeben und anschließend bei 600 W zunächst 15 min auf 200 °C erhitzt, dann weitere 20 min auf 200 °C gehalten. Anschließend wurde erneut 1 ml H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung mittels ICP-MS/MS, mit einer Massenverschiebungsmessung (Detektion/Messung) des Massenüberganges <sup>56</sup>Fe → <sup>72</sup>Fe durch eine Reaktion mit O<sub>2</sub> in der Reaktionszelle, um Interferenzen zu eliminieren. Der Kalibrierungsbereich lag zwischen 0-250 µg/l. Die Messung erfolgte in Triplikaten und der Eisengehalt im Kolon wurde auf die eingesetzte Menge des Kolongewebes bezogen. Die verwendeten Parameter sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Parameter für ICP-MS/MS-Messung

Vorwärtskraft	1550 W
Gasmodus	O <sub>2</sub>
Reaktionsfluss	0,3 l/min
Kühlungsfluss	15 l/min
Hilfsgasfluss	0,9 l/min
Vernebelungsgasfluss	1 l/min
Vernebelungstyp	MicroMist
Sprühkammer	Scott Typ
m/z Q1	56
m/z Q2	72
Integrationszeit	0,3 sec

### 3.11 Isolation intestinaler *Lamina propria* und intraepithelialer Lymphozyten

Um die genaue Lymphozytenpopulation der *Lamina propria* (LP) und des intraepithelialen (IE) Bereichs zu analysieren, wurden diese Lymphozyten in Zusammenarbeit mit [REDACTED]

[REDACTED] isoliert (Reissig *et al.*, 2014). Dazu wurden WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse nach 21 Tagen Fütterung (3.6.1) durch zervikale Dislokation getötet, das gesamte Kolon von Kotresten und Fettgewebe befreit und in kaltem PBS bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die anschließende Isolierung der IEL und LPL wurde von [REDACTED] durchgeführt. Das Kolon wurde longitudinal geöffnet und in ca. 0,5-1 cm Stücke geschnitten, in ein 50-ml-Röhrchen überführt und mehrfach durch Vortexen in eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Gewebestücke wurden in ein neues 50-ml- Röhrchen mit 20 ml des Vorverdau-Puffers überführt und 20 min bei 37 °C bei langsamer Rotation (40 ×g) inkubiert. Anschließend wurde die epitheliale Zellschicht, welche die IEL beinhaltet, durch intensives Vortexen 15 s und durch Sieben (Zellsieb, 100 µm) entfernt. Der Durchfluss enthält die IEL und kann bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert werden. Die Gewebestücke wurden in ein neues 50-ml-Röhrchen mit 20 ml der Vorverdaulösung überführt und erneut 20 min bei 37 °C bei langsamer Rotation (50 ×g) inkubiert. Anschließend wurde der Mix 15 s gevortext und erneut durch ein 100-µm-Zellsieb gegeben. Für die IEL-Isolation wurden die Überstände aller Vorverdau- und Waschschrte vereint und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Gewebestücke in eine Zellkulturschale transferiert und in 1 mm<sup>2</sup> Stücke mit einer Rasierklinge geschnitten. Das Gewebe wurde in ein gentleMACS™ Gefäß überführt und mit 2,5 ml Verdaulösung 30 min bei 37 °C inkubiert. Die LPL wurden anschließend mittels gentleMACS™ Dissoziator und dem Programm *Lamina propria* abgetrennt. Es wurden 10 ml FACS-Puffer zu jeder Probe gegeben und die Zellen durch Sieben (Zellsieb 100 µm) isoliert. Das Zellsieb wurde anschließend mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellsuspension für 20 min bei

300  $\times$ g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Für die weitere Aufreinigung der Lymphozyten wurden LPL- und IEL-Fractionen jeweils in 4 ml der 40 %-Fraktion eines 40:80 Percollgradienten resuspendiert und anschließend vorsichtig auf 8 ml der 80 %-Fraktion in ein 15-ml-Röhrchen geschichtet. Die Percoll-Gradiententrennung erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 1000  $\times$ g bei RT ohne Bremse. LPL und IEL waren jeweils in den jeweiligen Percollgradienten im weißen Ring der Interphase der Percoll-Lösungen sichtbar. Die Zellen wurden vorsichtig aufgenommen, in ein neues 15-ml-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer versetzt. Die Proben wurden bei 300  $\times$ g und 20 °C 10 min zentrifugiert, in FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die IEL und LPL mit Antikörper gefärbt (Tabelle 9), am FACS Canto II gemessen und mit der FlowJo887-Software ausgewertet.

### 3.12 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren, das auf dem Prinzip der spezifischen Antikörperbindung an ein Antigen in fixierten Geweben basiert. Primärantikörper binden dabei an das Zielprotein und werden durch einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt. Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes des Sekundärantikörpers mit einer bestimmten Wellenlänge können die Zielproteine an einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die in Paraffin-eingebetteten Gewebe (Kolon Abschnitt CB) (3.9) wurden zunächst bei -20 °C für 5-10 min gekühlt und anschließend mit Hilfe eines Mikrotoms in 5  $\mu$ m dünne Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden zur Entfaltung einige Minuten in ein 37 °C-warmes Wasserbad gelegt und anschließend auf einen *Superfrost* Objektträger transferiert. Die luftgetrockneten Schnitte wurden bei RT gelagert.

#### 3.12.1 Probenvorbereitung für IHC

Zunächst wurden die Gewebeschnitte für 30 min in einen 60 °C heißen Trockenschrank gegeben, um das Paraffin zu verflüssigen. Zum vollständigen Entfernen der Paraffinreste wurden die Objektträger in Xylol inkubiert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch Inkubation in prozentual absteigenden Ethanol-Lösungen und endete in einem PBS-Waschschritt (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Entparaffinieren und Rehydrierung von Kolongewebeschnitten für IHC**

Lösung	Anzahl der Schritte	Dauer
Xylol	3	5 min
EtOH 100 %	2	5 min
EtOH 96 %	1	5 min
EtOH 90 %	1	5 min
EtOH 80 %	1	5 min

EtOH 70 %	1	5 min
ddH <sub>2</sub> O	2	kurz waschen
PBS	1	kurz waschen

Die Demaskierung der Epitope erfolgte durch Inkubation der Proben mit DAKO *Target Retrieval Solution* bzw. 1x Natriumcitrat-Puffer in einem Dampfgarer für 20-60 min (Tabelle 21). Anschließend wurden die Proben für 20 min bei RT abgekühlt und zweimal mit PBS gewaschen.

### 3.12.1.1 Immunfluoreszenz

Pro Probe wurden jeweils 2 Organabschnitte mit einem Fettstift umkreist und anschließend mit der DAKO Blockierlösung für 2 h in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger kurz mit PBS gewaschen und über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 21 aufgelistet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger gründlich mit PBS/0,1 % Tween 20 (3x10 min) gewaschen. Die folgenden Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers zu vermeiden. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend der Tabelle 21 angesetzt und für 2 h bei RT in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer auf die Gewebeabschnitte gegeben. Anschließend wurde der überschüssige Sekundärantikörper durch Waschen (3x10 min, PBS/0,1 % Tween 20) entfernt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Inkubation der Gewebeabschnitte mit TO-PRO-3 (1:1000 in PBS) für 30 min bei RT. Die Objektträger wurden kurz mit PBS gewaschen und mit *Vectashield*-Eindeckmedium mit DAPI und einem Deckglas fixiert und zuletzt mit farblosem Nagellack versiegelt.

**Tabelle 21: Dauer der Epitop-Demaskierung und Antikörperverdünnungen für IHC**

IHC-Färbung (Antikörper)	Dauer der Demaskierung	Verdünnung des Primärantikörpers	Verdünnung des Sekundärantikörpers
CD3	20 min	1:300 in 2 % BSA/PBS	1:400 in PBS (Cy3 Ziege-anti-Ratte)
<i>Cleaved</i> Caspase 3	20 min	1:250 in 1 % BSA/PBS	1:500 in PBS (Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen)
Cox-2	30 min	1:250 in PBS/0,2 % Triton X 100	1:500 in PBS/0,2 % Triton X 100 (Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen)
F4-80	20 min	1:150 2 % BSA/PBS	1:500 in 2 % BSA/PBS (Cy3 Ziege-anti-Ratte)
HO-1	60 min	1:100 in PBS/0,2 % Triton X 100	1:500 in PBS/0,2 % Triton X 100 (Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen)

PCNA	60 min	1:250 in 1 % BSA/PBS/0,2 % Triton X-100	1:500 in PBS/0,2 % Triton X 100 (Alexa488 Ziege-anti-Maus)
pStat3	30 min	1:250 in PBS/0,2 % Triton X 100	1:500 in PBS/0,2 % Triton X 100 (Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen)
TUNEL	45 min	-	-
$\gamma$ H2AX	60 min	1:150 PBS/0,2 % Triton X 100	1:500 in PBS/0,2 % Triton X 100 (Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen)

### 3.12.1.2 Konfokale Mikroskopie

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden an einem Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop, welches mit einer LSM-710 konfokalen Mikroskopie-Einheit ausgestattet war, analysiert. In Tabelle 22 sind die Exzitations-/Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore aufgelistet.

**Tabelle 22: Exzitations-/Emissionswellenlänge der verwendeten Fluorophore**

Antikörper/Fluorophor	Laserwellenlänge	Exzitations-/Emissionsmaximum
TO-PRO 3	633 nm/647 nm	642 nm/661 nm
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488	488 nm	490 nm/525 nm
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488	488 nm	490 nm/525 nm
Ziege-anti-Ratte-Cy3	488 nm/532 nm	554 nm/568 nm

Nach mikroskopischer Kontrolle der Färbung beider Gewebeschnitte eines Objektträgers wurden pro Objektträger 8-12 Mikroskopiebilder aufgenommen. Die Laserintensität für die Anregung des Fluorophors des Sekundärantikörpers wurde zu Beginn eingestellt und innerhalb eines Experiments nicht mehr verändert, wohingegen die Intensität des 633 nm-Lasers zum Angleichen des TO-PRO-3-Signals verwendet werden konnte. Die Bilder wurden mit der Zeiss Zen 2011 Software aufgenommen. Zur Bearbeitung und Auswertung der Mikroskopieaufnahmen wurde die ImageJ-Software verwendet. Dargestellt wurden je nach Experiment die Anzahl positiver Zellen oder die gemessene Gesamtintensität.

### 3.12.2 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Deoxyuridine-Triphosphat (DUTP Nick end labeling (TUNEL-Assay))

Im Laufe der Apoptose wird der DNA-Strang durch die spezifische Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Somit können Hydroxylgruppen von DNA-Bruchstücken durch das Enzym terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (tDt) mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotiden versehen, und anschließend mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

visualisiert werden. Der TUNEL-Assay wird eingesetzt, um apoptotische Zellen mikroskopisch darzustellen und zu quantifizieren (Loo *et al.*, 1998).

Für die Untersuchung der Apoptose im Kolongewebe wurde der in Paraffin-eingebettete Kolonabschnitt CB verwendet und, wie in 3.12.1 gezeigt, für die Färbung vorbereitet. Zusätzlich wurde ein weiteres Präparat als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgeführt. Die Demaskierung erfolgte analog zur IHC für 45 min (Tabelle 21) in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer. Die Positivkontrolle wurde mit DNase (1 mg/ml BSA, 1x DNase Reaktionspuffer mit  $\text{MgCl}_2$ , 50 U/ml DNase) zum Verdau der DNA 10 min bei RT inkubiert. Der TUNEL-Assay wurde mithilfe des *In Situ Cell Death Detection Kit*, in dem alle benötigten Markierungs- und Enzym-Lösungen enthalten sind, durchgeführt. Die Durchführung der folgenden Schritte erfolgte unter dem Abzug. Für die Negativkontrolle wurden zunächst 100  $\mu\text{l}$  der Markierungslösung in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert und der verbleibende Rest mit der Enzym-Lösung (TUNEL-Lösung) vermischt. Pro Objektträger wurden zwei Gewebeabschnitte inklusive der Positivkontrolle mit je 50  $\mu\text{l}$  der TUNEL-Kombilösung in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit der Markierungslösung ohne Enzyme inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, mit TO-PRO-3 gefärbt und wie in 3.12.1.2 beschrieben weiterverarbeitet. Für die Mikroskopie wurden die Wellenlängen 488 nm für die TUNEL-Färbung und 633 nm für die Zellkernfärbung mit TO-PRO-3 verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Auszählung der TUNEL-positiven Zellen pro Bildausschnitt.

### 3.13 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-/Eosin-Färbung (H&E) gehört zu den Standardfärbungen der Histologie und wird zur pathologischen Untersuchung von Gewebeproben verwendet. Diese Färbung besteht aus zwei Färbelösungen, dem sauren Mayers Hämalaun und Eosin. Dabei dient das positivgeladene Hämalaun als Kernfärbung, da es im sauren Milieu selektiv an die negativgeladenen Phosphatgruppen der DNA und RNA im Nukleus und an DNA- bzw. RNA-haltige Zytoplasmastrukturen bindet. Durch den sauren pH-Wert der Färbelösungen liegen die Carbonsäuregruppen im Gewebe undissoziiert vor, wohingegen die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren negativgeladen bleiben. Es kommt zu einer ionischen Anziehung zwischen negativgeladenen Phosphatgruppen und der positivgeladenen Färbelösung. Man spricht bei der Hämalaun-Färbung von einer progressiven Endpunktfärbung, d.h. je länger die Färbezeit andauert, desto mehr Farbstoff kann binden. Durch das „Bläuen“ der Schnitte mit leicht alkalischem Leitungswasser wird eine permanente Bindung des Farbstoffes an das Gewebe erreicht. Dadurch wechselt die

Kernfärbung von rotbraun zu der charakteristischen Blaufärbung. Die Gegenfärbung wird mit Eosin durchgeführt. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der negativ geladen ist und an die positivgeladenen Proteine des Zytoplasmas, des extrazellulären Raums und des Bindegewebes bindet. Weiterhin werden Kernstrukturen gefärbt, die zuvor mit Hämalaun sichtbar gemacht wurden und eine rötlich-violette Mischfarbe aufweisen. Mit Eosin wird regressiv gefärbt, d.h. zunächst findet eine Überfärbung statt, welche dann mit H<sub>2</sub>O und verdünnten Alkoholen wieder abgeschwächt wird.

Für die H&E-Färbung wurden die in Paraffin-eingebetteten Gewebeabschnitte CB wie in 3.12.1 beschrieben, vorbereitet und das Paraffin im Trockenschrank für 30 min bei 60 °C erwärmt. Die Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte für H&E sind in Tabelle 23 erläutert.

**Tabelle 23: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten für Histologie**

Lösung	Anzahl der Schritte	Dauer
Xylol	3	3 min
EtOH 100 %	1	2 min
EtOH 96 %	1	2 min
EtOH 70 %	1	2 min
ddH <sub>2</sub> O	1	2 min

Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung und Rehydrierung mit Hämalaun und Eosin gefärbt und anschließend wieder dehydriert (Tabelle 24).

**Tabelle 24: H&E-Färbung und Dehydrierung von Paraffinschnitten für Histologie**

Lösung	Anzahl der Schritte	Dauer
saures Hämalaun nach Mayer	1	5-10 min
Leitungswasser fließend (Bläuen)	1	5-10 min
ddH <sub>2</sub> O	1	spülen
Eosin	1	3-5 min
ddH <sub>2</sub> O	1	kurz spülen
EtOH 70 %	1	gründlich spülen
mikroskopische Kontrolle		
EtOH 96 %	1	gründlich spülen
EtOH 100 %	2	2 min
Xylol	3	3 min

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem Eindeckmedium Entellan bedeckt und mit einem Deckglas verschlossen. Die gefärbten Schnitte wurden im Anschluss ca. 1 h luftgetrocknet und bis zur Mikroskopie bei RT gelagert. Die mikroskopischen Scan-Aufnahmen wurden in Kooperation mit [REDACTED] mit einem automatisierten Nanozoom-Mikroskop durchgeführt.



Die histopathologische Auswertung und die Bearbeitung erfolgte durch [REDACTED] mithilfe der NDP.view2-Software.

### 3.14 Proteinlysate aus Kolongewebe

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden 20-30 mg schockgefrorenes Kolongewebe des Abschnitts C2 verwendet. Die folgenden Schritte wurden stets auf Eis mit einer Maximalanzahl von zwölf Proben pro Durchlauf durchgeführt. Gefrorene Gewebestücke wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und in 200-300 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer mithilfe eines Metall-Pistills gemörsert. Anschließend erfolgten die Homogenisierung und der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung für 10 Impulse (20 % *Power*, 50 % *duty cycle*) jeweils zweimal. Dabei wurden die Proben stets auf Eis gehalten. Die Lysate wurden im Anschluss bei 4 °C mit 15000 ×g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleinere Mengen (ca. 50 µl) aliquotiert, um durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren keinen Qualitätsverlust der Proben zu riskieren. Die Aliquots wurden in IN<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 3.14.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, welche auf der Verschiebung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 beruht. Durch die sauren Bedingungen liegen die basischen Seitenketten der Proteine in protonierter Form vor, wodurch der Farbstoff ionische Wechselwirkungen mit diesen Seitenketten eingeht.

Zur Messung wurden stets 10 µl der verdünnten Probe bzw. der BSA-Standardverdünnungsreihe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend jeweils 110 µl des Bradford-Reagenz hinzugegeben. Alle Proben wurden vorsichtig resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer. Die Messung wurde stets in Triplikaten durchgeführt. Bei dieser Messung verhält sich die Absorption linear zur Proteinkonzentration, welche anhand einer stets mitgeführten BSA-Standard-Reihe ermittelt wurde.

#### 3.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

##### 3.14.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte mit einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei bindet das anionische Tensid SDS an Proteine, denaturiert diese und überdeckt deren Ladung durch eine starke negative Eigenladung. Diese negative Gesamtladung verhält sich linear zur molekularen Masse des Proteins. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die

Proteine zur Anode. Die SDS-PAGE ist ein diskontinuierliches Gelsystem, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Gele unterscheiden sich sowohl in der Porengröße als auch im pH-Wert des verwendeten Puffers. Im 5 %-igen Sammelgel mit neutralem pH-Wert (pH 6,8) werden die Proteine konzentriert und schließlich in dem höherprozentigen Trenngel (10 %, 12,5 %, 15 %) bei einem pH von 8,8 nach den Molekulargewichten aufgetrennt.

**Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

Reagenz	Sammelgel	Trenngel		
	5 %	10 %	12,5 %	15 %
Sammelgelpuffer (Tris 0,625 M, pH 6,8)	1,2 ml	-	-	-
Trenngelpuffer (Tris 1 M, pH 8,8)	-	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
Arcylamid/Bisacrylamid (30% 37,5:1)	0,75 ml	4,5 ml	5,625 ml	6,75 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,81 ml	8,64 ml	7,515 ml	6,39 ml
SDS 10 %	0,12 ml	0,18 ml	0,18 ml	0,18 ml
TEMED 100 %	0,006 ml	0,009 ml	0,009 ml	0,009 ml
APS (100 mg/ml)	0,06 ml	0,09 ml	0,09 ml	0,09 ml

Die Trenngel-Lösung (Tabelle 25) wurde zunächst zwischen zwei gereinigten Glasplatten vorgelegt und bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und durch das 5 %-ige Sammelgel (Tabelle 25) ersetzt. Zur Bildung der Taschen wurde ein entsprechender Kamm verwendet. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt, welche mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt wurde. Das Entfernen von Gelresten erfolgte durch Spülen der Taschen mit 1x SDS-Laufpuffer. Zur Probenvorbereitung wurden alle Proben auf die gleiche Proteinkonzentration angeglichen (3.14.1), mit ddH<sub>2</sub>O auf dasselbe Volumen aufgefüllt und im Verhältnis 1:5 mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Größenorientierung wurden auf jedes Gel 5 µl des *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel und im Trenngel wurden die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA aufgetrennt.

### 3.14.2.2 Wet-Blot Transfer

Um die Proteine nach der Auftrennung durch die SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurde das Gel auf der Membran platziert und mit folgendem Aufbau in eine *Wet-Blot*-Kammer eingespannt: Schwamm, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm. Alle Materialien wurden vor Verwendung kurz in 1x Blot-Puffer äquilibriert. Beim Zusammenbau ist stets auf das Vermeiden von Luftblasen

zu achten. Die Kammer wurde, mit der Membran zur Anode gerichtet, in den Elektrophoresetank eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 2 h und wurde mittels reversibler Ponceau-S-Färbung überprüft.

### 3.14.2.3 Immunodetektion

Um unspezifische Bindestellen der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran zu blockieren, wurde diese für 1 h in einer 5 %-igen Magermilchpulver-Lösung in TBS-T auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend kurz in TBS-T gewaschen und mit den gewünschten Primärantikörpern 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tabelle 26).

**Tabelle 26: Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blot**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper
Anti-Hsp90	1:1000 in TBS-T	1:2000 Ziege-anti-Kaninchen-HRP in 5 % Magermilchpulver in TBS-T
Anti-Erk2	1:1000 in TBS-T	1:2000 Ziege-anti-Maus-HRP in 5 % Magermilchpulver in TBS-T
Anti-p53 (1c12)	1:1000 5 % Magermilchpulver in TBS-T	1:2000 Ziege-anti-Maus-HRP in 5 % Magermilchpulver in TBS-T
Anti-γH2AX	1:1000 in TBS-T	1:2000 Ziege-anti-Kaninchen-HRP in 5 % Magermilchpulver in TBS-T

Anschließend wurde die Membran 3×5 min mit TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tabelle 26) 1 h bei RT inkubiert. Nach der Sekundärantikörperbehandlung wurde ungebundener Antikörper erneut in drei fünfminütigen Waschschritten entfernt.

Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Primärantikörper. Dabei bindet der Primärantikörper an das an der Membran gebundene Protein und der Sekundärantikörper, welcher an eine *Horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, bindet an den speziesspezifischen Primärantikörper. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert die HRP das Luminol, wodurch die entstehende Chemilumineszenzreaktion die Detektion der Proteine ermöglicht. Die entstandene Lichtemission bei 438 nm resultiert in einer Schwärzung fotografischer Filme, wobei die Intensität der katalysierten Reaktionen mit der Proteinmenge korreliert. Es wurde je nach erwarteter Lumineszenzstärke entweder kommerziell erhältliches oder selbsthergestelltes ECL-Reagenz (*enhanced* Chemilumineszenz) verwendet. Unabhängig von dem verwendeten ECL-Reagenz wurden stets beide Komponenten im Verhältnis 1:1 gemischt und auf der Membran verteilt. Die Inkubation der ECL-Lösung erfolgte 1 min bzw. 3 min im Dunklen. Die überschüssige ECL-Lösung wurde entfernt und die Chemilumineszenz unter Verwendung von Röntgenfilmen

in einer Dunkelkammer oder mit Hilfe des ChemiDocs von BioRad sichtbar gemacht. Die Röntgenfilme wurden bis zum Erscheinen der Banden in eine Entwickler-Lösung getaucht und mit einer Fixier-Lösung im Anschluss inkubiert. Anschließend wurden die entwickelten Filme eingescannt und mittels Photoshop und ImageJ bearbeitet. Die im ChemiDoc entwickelten digitalen Bilder wurden direkt mit der Software ImageLab von BioRad bearbeitet und quantifiziert.

### 3.14.2.4 *Strippen der Membran: pH-Methode*

Um weitere auf der Nitrozellulose-Membran befindlichen Proteine zu detektieren, müssen die spezifisch gebundenen Primär- und Sekundärantikörper von der Membran gelöst werden. Dies kann über die Änderung des pH-Wertes erfolgen.

Bei der pH-Methode erfolgte die Inkubation der Membran mit zwei verschiedenen Strip-Puffern. Zuerst wurde Strip-Puffer A (pH 2,0) für 5 min auf die Membran gegeben, anschließend 10- bis-15-mal gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 min mit Strip-Puffer B (pH 11,0) inkubiert. Die Membran wurde anschließend wieder 10- bis 15-mal ausgiebig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut 1 h bei RT in einer 5 %-igen Magermilchpulverlösung in TBS-T blockiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit TBS-T wurde die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert.

## 3.15 DNA-Isolation und Bestimmung der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen

Zur Bestimmung der prämutagenen DNA-Läsion O<sup>6</sup>-MeG, wurden die Mäuse, wie in 3.6 beschrieben, behandelt und das Gewebe analog zu 3.9 entnommen und konserviert. Die DNA-Adduktlevel wurden mittels Slot-Blot-Assay bestimmt.

### 3.15.1 DNA-Isolation mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Zur DNA-Isolation wurden ca. 20-30 mg des schockgefrorenen Kolonabschnittes C1 verwendet. Das Gewebe wurde zunächst mechanisch mit einem Metall-Pistill in 300 µl kaltem TE-Puffer (pH 9) homogenisiert und anschließend mit RNase A (30 µg) 1,5 h bei 25 °C auf einem Schüttelinkubator bei 700 rpm inkubiert. Der Proteinverdau erfolgte über Nacht (mind. 18 h) durch die Zugabe von Proteinase K (20 µg/ml) und 1 % SDS auf 48 °C auf einem Schüttelinkubator bei 1100 rpm. Die DNA wurde mithilfe der Phenol-Chloroform-Methode extrahiert. Dazu wurden 350 µl des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs auf die Proben gegeben, mind. 15 s gevortext und bei 14000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut 350 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol dazugegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal zur Abtrennung der DNA von Proteinen und anderen Zellbestandteilen wiederholt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch die Zugabe von

750 µl eines Mastermixes (90 % EtOH, 1 M NH<sub>4</sub>OAc). Die Proben wurden 10x vorsichtig invertiert und zur besseren DNA-Fällung bei 4 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 %-igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die DNA wurde in 50-100 µl lqTE-Puffer (pH 8) gelöst und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Die DNA-Extrakte wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

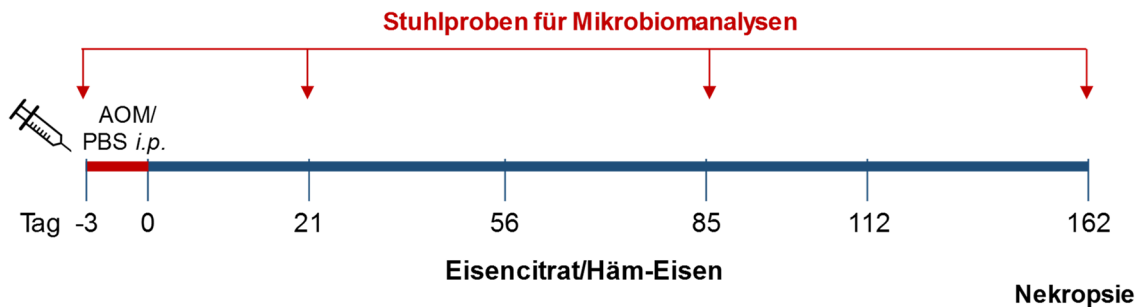
### 3.15.2 Bestimmung der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen mittels Immuno-Slot-Blot

Die O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen wurden mithilfe eines Immuno-Slot-Blot-Assays bestimmt (Göder *et al.*, 2015). Zu diesem Zweck wurden jeweils 500 ng DNA (Gesamtvolumen 100 µl in TE-Puffer pH 8) pro Ansatz für 10 min bei 100 °C und 600 rpm denaturiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Ammoniumacetat (2 M) dazugegeben und die Proben direkt auf Eis gestellt, um die DNA einzelsträngig zu halten. Mithilfe einer Dot-/Slot-Blot Apparatur, die an eine Vakuum-Pumpe angeschlossen wurde, wurde die DNA auf eine positivgeladene Nylon-Membran übertragen und 1,5 h bei 95 °C hitzefixiert. Anschließend wurde die Membran mit 5 % Magermilchpulverlösung in TBS-T blockiert und über Nacht mit dem spezifischen O<sup>6</sup>-MeG-Antikörper (1:500 in TBS-T) bei 4 °C inkubiert. Nicht-gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min entfernt und die Membran für 1 h mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 Ziege-anti-Maus-HRP in 5 % Magermilchpulver in TBS-T) bei RT inkubiert. Analog zum Western-Blot (3.14.2.3) wurde anschließend die Membran erneut 3x 5 min mit TBS-T gewaschen und mit der kommerziell-erhältlichen ECL-Lösung (1:1) für 3 min inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde analog zu (3.14.2.3) mithilfe des ChemiDoc dokumentiert und die Bearbeitung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Software ImageLab von BioRad. Es wurden stets Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten HCT116-Zellen, die nur mit O<sup>6</sup>-BG, einem MGMT-Inhibitor, vorbehandelt wurden, wohingegen die Positivkontrolle zusätzlich mit 1000 µM Temozolomid für 2 h inkubiert wurde. Für die Berechnung der relativen O<sup>6</sup>-MeG, wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe auf eins gesetzt und die Proben relativ darauf bezogen.

### 3.16 Mikrobiomanalysen

Für die Mikrobiomanalysen wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 7-8 Wochen von Envigo kommerziell erworben und, wie in 3.6 beschrieben, gruppiert und markiert. Die Mäuse wurden für 7 Tage zur Anpassung ihres Mikrobioms akklimatisiert. Zum Sammeln der frisch generierten Kotproben wurde jede Maus bis zur Defäkation in ein desinfiziertes Becherglas gesetzt, anschließend die Kotprobe mittels Pinzette entnommen

und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn, d.h. vor der AOM/PBS-Injektion, wurden die Proben für Tag -3 gesammelt. Weitere Stuhlproben wurden an den Tagen 21, 85 und 162 nach Start der Fütterung gesammelt. Der genaue Versuchsablauf ist in 3.6.2 beschrieben und in Abb. 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Übersicht der Langzeitexperimente für Mikrobiomanalysen.**

Vor Versuchsbeginn wurde den Mäusen PBS oder AOM (15 mg/kg KG) i.p. injiziert und 72 h nach der Injektion mit einer Eisencitrat- oder Häm-Eisen-haltigen Diät für 162 Tage gefüttert. Vor der Injektion und an den Tagen 21, 85 und 162 wurden Stuhlproben für die Mikrobiomanalysen gesammelt.

### 3.16.1 Isolation der bakteriellen genomischen DNA für Mikrobiomanalysen

Die DNA-Isolation für die Mikrobiomanalysen erfolgte mittels *PSP Stool DNA Plus Kit* der Firma Stratec Molecular und die bakterielle DNA wurde nach leicht modifizierten Herstellerangaben aus den schockgefrorenen Kotproben (3.6.2) isoliert. Je ein Stuhlpellet wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und zusammen mit 600 µl des mitgelieferten Lysepuffers P und einem Metall-Pistill homogenisiert. Nach 10-minütiger Inkubation der Proben auf einem Thermoschüttler bei 95 °C und 900 rpm wurden die Stuhlproben erneut mittels Metall-Pistill gemörsert. Die homogene Masse wurde anschließend mit jeweils 5 *Zirconia*-Kügelchen mindestens 2 min gevortext und 1 min bei 11000 ×g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein *InviAdsorb*-Reaktionsgefäß gegeben, 15 s gevortext und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Um weitere Schwebstoffe zu entfernen, wurde erneut 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 25 µl der mitgelieferten Proteinase K-Lösung in einem neuen Reaktionsgefäß nach Resuspension 10 min bei 70 °C und 900 rpm inkubiert. Es wurden jeweils 100 µl des Bindepuffers A dazugegeben und anschließend der komplette Mix auf eine Filtersäule gegeben. Die Proben wurden 1 min bei RT inkubiert, 2 min bei 11000×g zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Auf die Filtersäulen wurden je 300 µl Waschpuffer I gegeben und bei 11000×g für 1 min zentrifugiert. Die Filtersäulen wurden in ein neues Auffangreaktionsgefäß

transferiert, mit 400 µl Waschpuffer II bei 11000×g für 1 min zentrifugiert und erneut in ein neues Auffangreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben bei voller Geschwindigkeit 4 min zentrifugiert und die Filtersäule in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert. Die DNA wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit 60-80 µl des 70 °C-heißen Elutionspuffers von der Filtersäule gelöst und bei 11000 ×g für 1 min zentrifugiert. Bei Bedarf kann der letzte Schritt wiederholt werden. Die DNA-Bestimmung erfolgte zunächst mithilfe eines NanoDrop 1000 und wurde durch die Messung am Qubit nochmals verifiziert.

### 3.16.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Qubit

Die DNA wurde mithilfe eines Qubit-Fluorometers und dem *dsDNA HS Assay-Kit* bestimmt. Mit diesem Kit können sehr geringe DNA-Konzentrationen von 10 pg/µl-100 ng/µl bestimmt werden. Um eine grobe Einordnung der DNA-Konzentrationen vornehmen zu können, wurden alle Proben zunächst mittels NanoDrop gemessen und anschließend mit alternativer Verdünnung mit dem Qubit-Kit analysiert. Dazu wurden die Standards I und II jeweils 1:10 und die Proben 1:200 in der *Workingsolution* verdünnt, gevortext und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurden laut Instruktionen des Qubit-Fluorometers zunächst die Standards und dann die Proben gemessen. Die DNA Konzentration errechnete sich mithilfe folgender Formel:

$$DNA\ Konzentration = Qubit\ Wert \times \frac{200}{eingesetzte\ \mu l\ (1\mu l)}$$

Zur weiteren Analyse wurden die Proben an [REDACTED] gesendet und ausgewertet.

### 3.16.2 Next generation sequencing (NGS) der Mikrobiomproben

Die bakterielle genomische DNA von murinen Stuhlproben wurde wie in 3.16.1 beschrieben, isoliert. Es wurden je 10 ng der bakteriellen *Template*-DNA eingesetzt und die V3- und V4-Regionen der 16S rRNA-Gene vervielfältigt. Dazu wurden degenerierende regionsspezifische und Barcode-beinhaltende *Primer* und *Illumina Flow Cell* Adapter-Sequenzen sowie der NEBNext Ultra II Q5 Mastermix in einer Reaktion mit 25 PCR-Zyklen (98 °C 20 s, 72 °C 40 s) amplifiziert (Fadrosh *et al.*, 2014). Amplikons wurden anschließend mit *Agencourt AMPure XP Beads* aufgereinigt, normalisiert und vor der Sequenzierung am Illumina MiSeq in einem 600-Zyklen endgepaarten Kit und den Standard Illumina Sequenzierungsprimern HP10 und HP11 durchgeführt. Die daraus resultierenden *fastq*-Dateien wurden bioinformatisch mit der 64 bit-Version der *Usearch* 10-Software, übereinstimmend mit der *Uparse-Pipeline*, ausgewertet (Edgar, 2013). Operationale



taxonomische Einheiten (*operational taxonomic units*, OTUs) wurden bei einem Schwellenwert von 95 % Ähnlichkeit ausgesucht und taxonomisch durch den Vergleich repräsentativer OTU-Sequenzen zu den Referenzdaten des Ribosomalen-Datenbanken-Projekts (RDP Version 16) klassifiziert. Alpha-Diversität ( $\alpha$ -Diversität), Probenabstand und relative unterschiedliche Häufigkeit nach Verdünnung wurden mit dem *MicrobiomeAnalyst* berechnet (Dhariwal *et al.*, 2017).

### 3.17 Herstellung des Fäkalwassers und Analysen

Für die Herstellung von Fäkalwasser wurden murine Kotproben, wie in 3.6.2 beschrieben, an den Tagen 21, 56, 85, 112 und 162 aus den Käfigen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Die Herstellung des Fäkalwassers, die Messung der darin enthaltenen Nitrosoverbindungen sowie die Zytotoxizitätstestung des Fäkalwassers wurden, in Kooperation mit [REDACTED] durchgeführt.

#### 3.17.1 Herstellung von Fäkalwasser aus Kotproben

Unmittelbar vor der Verarbeitung wurden die Kotproben von Einstreu getrennt und mithilfe einer Feinwaage abgewogen. Anschließend wurden alle Proben mit Reinstwasser (0,09 g/ml) versehen und jedes Reaktionsgefäß mit drei Edelstahlkugeln für 20 min bei 4 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, 2 h bei 4 °C mit 50000×g zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C eingefroren.

#### 3.17.2 Bestimmung der fäkalen Nitrosoverbindungen

Die Fäkalwasserproben wurden, wie in 3.17.1 beschrieben, hergestellt und auf verschiedene Nitrosoverbindungen analysiert. Die Methode ist eine Modifikation einer Kombination zweier Methoden von (Kuhnle *et al.*, 2007) und (Joosen *et al.*, 2009). Mittels Ecomedics CLD88 wurden die scheinbaren Gesamtnitrosoverbindungen (*apparent total nitroso compounds*, ATNCs), Quecksilber(II)- und ferricyanidstabile und instabile Nitrosoverbindungen bestimmt. Jede Fäkalwasserprobe wurde in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde zur Entfernung von Nitrit mit Sulfanilamid (30 mg/ml in 1 M HCl) vorbehandelt. Diese Probe wurde dann für die Bestimmung der ATNCs verwendet. Das zweite Aliquot wurde mit wässrigem Quecksilberchlorid ( $\text{HgCl}_2$ , 14,5 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) für 30 min zur Gewinnung von Quecksilber(II)-stabilen Verbindungen (RSNO) vorbehandelt. Nach 30 min Vorbehandlung wurde Nitrit mit Sulfanilamid entfernt. Zur Gewinnung von Kaliumhexacyanidoferrat(III)-stabilen Nitrosoverbindungen (NO-Häm) wurde das dritte Aliquot mit einer  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$ -Lösung (38 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit Sulfanilamid behandelt. Alle Proben wurden im Dunkeln auf Eis gelagert



und vorbereitet. Die Analyse wurde im Dunkeln durchgeführt, um jegliche Einflüsse von UV-Licht auszuschließen. Von jeder vorbehandelten Fäkalwasserprobe wurden 100 µl in ein *Purge Vessel* gegeben und zusammen mit 8 ml Eisessig, 2 ml flüssigem Kaliumiodid (50 mg/ml), 0,4 ml Kupfersulfat (50 mg/ml) und 100 µl *Antifoam* vermischt und auf 37 °C inkubiert. Zum Mischen der Proben und Transferieren des NO in den *Ecomedics CLD 88 Analyzer* durch einen Kondensator und einen Polypropylen-Filter (0,2 µm, Whatmann, USA) wurde Stickstoff durch eine Glasfritte eingeleitet. Das resultierende Chemilumineszenzsignal von Ozon wurde mit NO detektiert und mit der Instrumentsoftware verarbeitet. Nach jeder Injektion wurden die *Purge Vessel* geleert, gewaschen und mit frischer Reaktionslösung befüllt. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich mit einer Standardkurve (3-300 mM). Es wurden stets die Flächen unter der Kurve der Probe mit der der Standardkurve verglichen.

Nitrosothiole (RSNO) wurden zur Unterscheidung von Quecksilber(II)-stabilen und -instabilen Verbindungen, NO-Häm als Unterschied zwischen Ferricyanid-stabilen und -instabilen Verbindungen und RNNO als Unterschied zwischen ATNCs und der Summe aus RSNOs und NO-Häm bestimmt. Die Ergebnisse wurden als pmol der NO-Verbindung pro mg Fäkalprobe dargestellt.

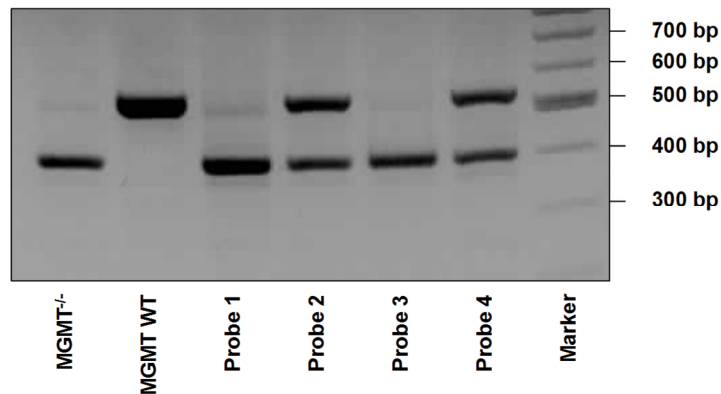
### 3.17.3 Messung der NOC-induzierten Fäkalwasserzytotoxizität

Die in 3.17.1 angesetzten Fäkalwasserproben wurden auf Induktion von Zytotoxizität in zwei humanen Kolonepithelzelllinien getestet. Es wurden die nicht-transformierte HCEC (1ct) Zelllinie und die Kolorektalkarzinom Zelllinie HCT116 verwendet. HCEC (1ct) Zellen wurden unter hypoxischen (2 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) Bedingungen in DMEM Glutamax/Medium199 (4:1) kultiviert (Roig *et al.*, 2010). HCT116 Zellen wurden unter normalen Sauerstoffbedingungen (21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) in DMEM Zellkulturmedium kultiviert. Für die Zytotoxizitätsanalyse wurden die Zellen auf 96-Well-Platten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^3$  (HCEC) und  $3 \times 10^3$  (HCT116) ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wurden diese mit den Fäkalwasserproben, die zuvor 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, für 24 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach 24 h durch Messung des ATP-Gehalt in permeabilisierten Zellen mittels *CellTiterGlo® Lumineszenz Assay* bestimmt. Das alte Medium wurde entfernt und durch neues Medium mit 50 % *CellTiterGlo®*-Reagenz ersetzt. Die Zellen wurden damit für 10 min lysiert und das Lumineszenzsignal anschließend bei 490 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Das Lumineszenzsignal korreliert dabei mit der von lebenden Zellen produzierten Menge an ATP.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Genotypisierung der MGMT-defizienten Mäuse

Vor Versuchsbeginn wurde der Genotyp der in der TARC-gezüchteten MGMT-Mäuse, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, mittels PCR bestimmt. Dazu wurde genetisches Material aus den Schwanzspitzen oder Ohrstanzen verwendet. Abb. 18 zeigt eine repräsentative Aufnahme eines Agarosegels mit den PCR-Produkten nach der MGMT-Genotypisierungs-PCR. Zusätzlich wurden zum Vergleich jeweils eine Probe mit homozygot-wildtypischen Allelen (WT) und eine mit homozygot-mutierten MGMT-Allelen (MGMT<sup>-/-</sup>) aufgetragen. Die PCR-Produkte einer Probe mit WT-Allelen zeigen eine Bande bei 542 bp und die mit MGMT-mutierten Allelen eine bei 409 bp. Die Proben 2 und 4 sind demnach heterozygot, wohingegen die Proben 1 und 3 homozygot-mutierte MGMT-Allele aufweisen. Homozygote MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die folgenden *in vivo*-Experimente verwendet.



**Abbildung 18: Repräsentative Aufnahme einer MGMT-Genotypisierungs-PCR.**

1,5 %-iges Agarosegel mit den PCR-Produkten von MGMT-profizienten (WT) und -defizienten (MGMT<sup>-/-</sup>) Tieren, sowie den unbekannten Proben und einem DNA-Größenmarker. Das PCR-Produkt des wildtypischen Allels hat eine Größe von 542 bp, das der Mutante von 409 bp.

### 4.2 Intestinale Aufnahme von Eisencitrat im Vergleich zu Häm-Eisen

Zur Überprüfung der intestinalen Aufnahme von Eisen über die Kolonozyten wurde der C4-Abschnitt des Kolongewebes von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach einer 21-tägigen Eisen-balancierten Diät mit Eisencitrat oder Häm-Eisen (3.6.1) mittels ICP-MS/MS (3.10) von AG

bestimmt.

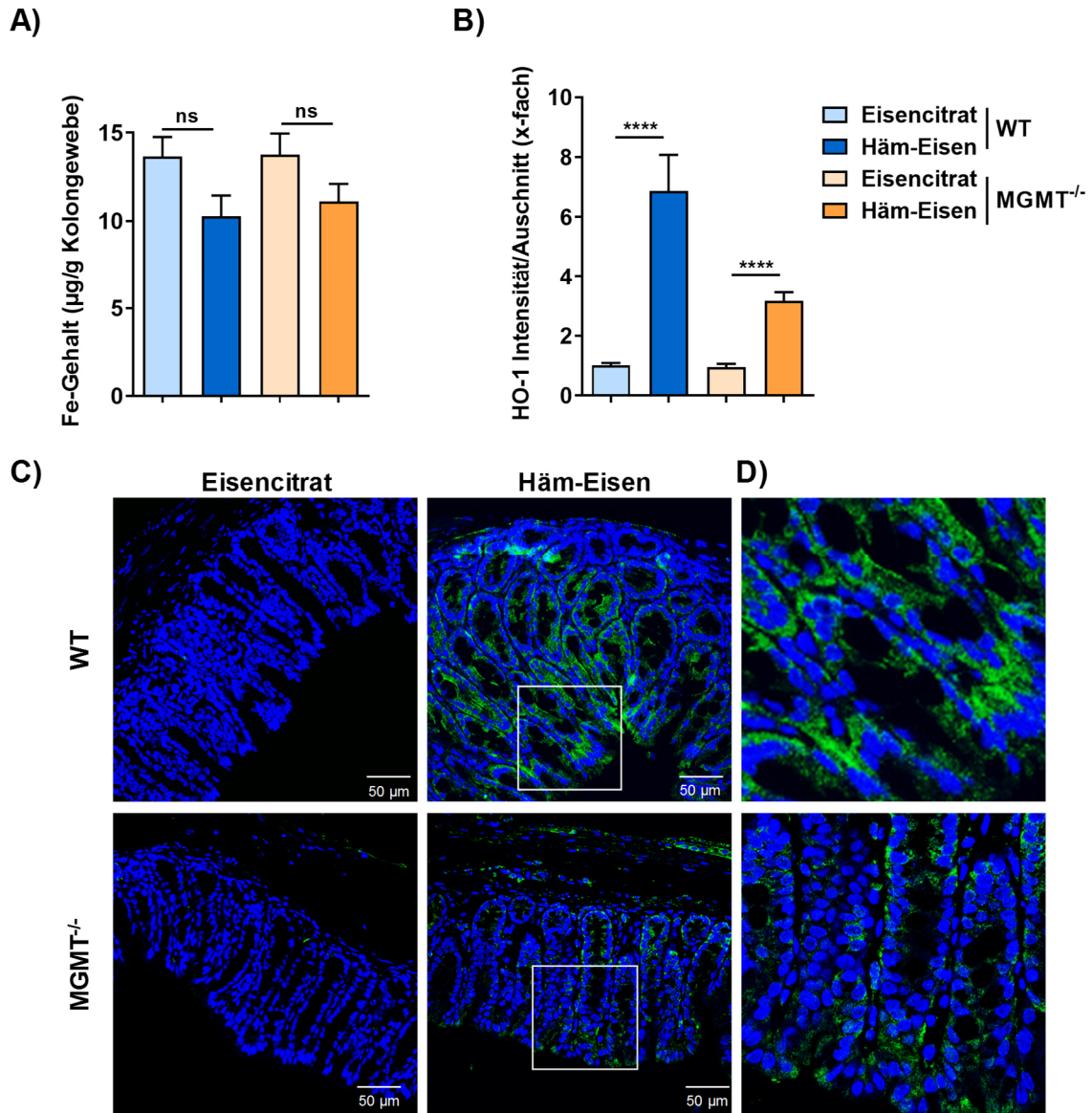
Die ICP-MS/MS Ergebnisse der Eisenaufnahme in das Kolonepithel sind in Abb. 19 A dargestellt. Obwohl der Eisengehalt nach der Eisencitratdiät im Kolonepithel beider Genotypen im Vergleich zu Häm-Eisen leicht erhöht war, wurden hier keine signifikanten

Unterschiede gemessen. Mittels ICP-MS/MS wurde im Kolon der WT Tiere nach Eisencitrat ein Wert von ca. 13,6 µg Fe/g Kolongewebe und nach Häm-Eisen ca. 10 µg/g gemessen. Vergleichbare intestinale Aufnahmeraten wurden in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet. Hier ergab die Messung nach Eisencitrat ca. 13,7 µg Fe/g Kolongewebe und ca. 11 µg Fe/g Kolongewebe nach Häm-Eisen, wobei keine signifikanten Unterschiede vorliegen. Eisencitrat und Häm-Eisen werden gleichermaßen ins Kolonepithel aufgenommen.

Ein zusätzlicher indirekter Nachweis für die Häm-Eisenaufnahme ins Kolonepithel erfolgte über die immunhistochemische Analyse der Häm-Oxygenase 1 (HO-1) mittels konfokaler Mikroskopie (3.12). HO-1 katalysiert die Reduktion von Häm-Eisen zu dreiwertigem Eisen, CO und Bilirubin (siehe 1.4.1). Nach erfolgreicher intestinaler Aufnahme von Häm-Eisen kommt es intrazellulär zur Induktion von HO-1. Diese Expressionssteigerung kann als indirekter Marker für die Aufnahme von Häm-Eisen ins Kolonepithel genutzt werden. In Abb. 19 B sind die quantitativen Auswertungen der HO-1-Färbung beider Genotypen dargestellt. Die Quantifizierung zeigt eine signifikant erhöhte HO-1-Intensität in beiden Genotypen nach einer 21-tägigen Häm-Eisen-haltigen Diät, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Das Kolonepithel wildtypischer Mäuse wies nach Häm-Eisen einen Anstieg der HO-1-Level auf ca. das 7,5-fache im Vergleich zur Eisencitrat-Gruppe auf. In den MGMT-defizienten Mäusen war die HO-1-Intensität um ca. das 3,3-fache erhöht. Ein Vergleich der Genotypen untereinander ergab ein signifikant erhöhtes HO-1-Level in WT Tieren, verglichen mit den MGMT<sup>-/-</sup> (Abb. 55 A siehe Anhang).

Abb. 19 C zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der HO-1-Färbung beider Genotypen. Im Vergleich zu Eisencitrat bewirkte Häm-Eisen einen deutlichen Anstieg des HO-1-Signals mit einer mehrheitlich luminalen Verteilung des Signales. In den in Abb. 19 D visualisierten Vergrößerungen wird die zytoplasmatische Lokalisation der HO-1 deutlich. Der Vergleich der Genotypen untereinander ergab signifikant höhere HO-1-Signale in WT Tieren nach Häm-Eisen, verglichen mit den MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 55 B siehe Anhang).

Zusammenfassend wird sowohl diätisches Eisencitrat als auch Häm-Eisen in einem ähnlichen Umfang ins Kolonepithel aufgenommen, wobei nur Häm-Eisen zu einer signifikant erhöhten HO-1-Induktion führt.



**Abbildung 19: Intestinale Eisenaufnahme ins Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Tiere erhielten 21 Tage eine Diät mit Eisencitrat oder Häm-Eisen. A) Quantitative Auswertung der Eisenaufnahme mittels ICP-MS/MS. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6) gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant. B) Quantifizierung der HO-1-Intensität. Aufgetragen wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n $\geq$ 5, 8-10 Aufnahmen pro Tier) und die statistische Auswertung erfolgte mit *Student's t-Test*. \*\*\*\*p<0,0001. C) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von murinen Kolonschnitten. Die Aufnahmen wurden bei einer 40x Vergrößerung und einem digitalen Zoom von 0,6 aufgenommen. Zellkerne sind in Blau (TO-PRO-3) und HO-1-Signale in Grün dargestellt. D) Vergrößerung der in C) dargestellten Mikroskopiebilder nach Häm-Eisen.

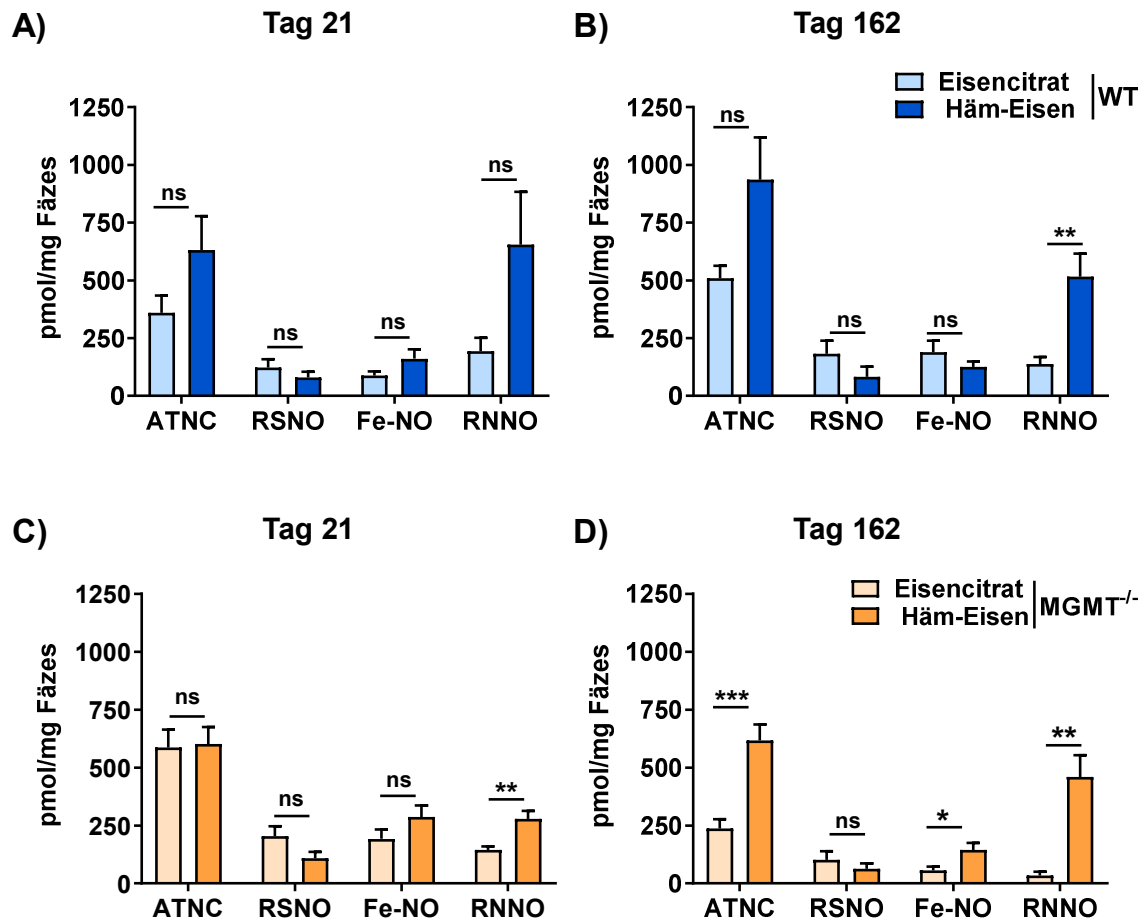
## 4.3 Analyse der Häm-Eisen-vermittelten Bildung endogener NOCs

### 4.3.1 Anstieg fäkaler NOCs nach Häm-Eisen-haltiger Diät

Frühere Studien legen nahe, dass Häm-Eisen in Verdacht steht, die endogene Bildung von NOCs zu steigern (Bastide *et al.*, 2015; Bastide *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 2003). Um diese Aspekte näher zu untersuchen, wurden Stuhlproben von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach unterschiedlichen Zeitpunkten während des Fütterungsexperimentes gesammelt (3.6.2). Die Herstellung des Fäkalwassers sowie die anschließenden Analysen wurden von [REDACTED] durchgeführt (3.17).

Die NOCs wurden als ATNCs, also der Gesamtheit der messbaren Nitrosoverbindungen dargestellt. Die Ergebnisse der Messung fäkaler NOCs sind in Abb. 20 dargestellt. Zunächst wurde die endogene Bildung von NOCs im Stuhl wildtypischer Mäuse nach 21 Tagen als ATNCs bestimmt (Abb. 20 A). Nach Fütterung mit Eisencitrat für 21 Tage wurden durchschnittlich 360 pmol ATNCs/mg Fäzes gemessen. Bei Gabe von Häm-Eisen-haltigem Futter stiegen die ATNCs auf ca. 630 pmol/mg Fäzes, was jedoch statistisch nicht signifikant war. Diese Tendenz wird v.a. durch die Analyse der N-Nitrosoverbindungen (RNNOs) bestätigt. Hier bewirkte Häm-Eisen eine durchschnittliche Steigerung auf das 3,4-fache bezogen auf die RNNO-Menge nach Eisencitrat. Die Analyse der Nitrosyl-Eisenverbindungen (Fe-NOs) nach Häm-Eisen ergab eine nicht signifikante Expansion von ca. 90 pmol/mg nach Eisencitrat auf ca. 160 pmol/mg Fäzes. Die Messung der Nitrosothiole (RSNOs) zeigte dagegen eine Reduktion von durchschnittlich 120 pmol/mg Fäzes nach Eisencitrat auf einen mittleren Wert von 80 pmol/mg Fäzes nach Häm-Eisen, ohne statistische Signifikanz.

Abb. 20 B repräsentiert die Ergebnisse der fäkalen NOC-Messung der WT Tiere nach 162 Tagen Fütterung. Auch hier ist die Tendenz einer Häm-Eisen-vermittelten Steigerung der fäkalen NOCs erkennbar. Die ATNCs nahmen von durchschnittlichen 510 pmol/mg nach Eisencitrat auf 940 pmol/mg Fäzes nach Häm-Eisen zu. Auch die RNNOs zeigten nach Häm-Eisen einen signifikanten Anstieg von ca. 140 pmol/mg auf 520 pmol/mg Fäzes. Ähnlich zu den Ergebnissen nach 21 Tagen wurde bei den RSNOs nach 162 Tagen eine nicht signifikante Abnahme der RNSOs von ca. 180 pmol/mg nach Eisencitrat auf ca. 80 pmol/mg Fäzes nach Häm-Eisen beobachtet. Häm-Eisen bewirkte zudem eine schwache, nicht signifikante Abnahme der Fe-NOs, verglichen mit der Eisencitratdiät (130 pmol/mg vs. 190 pmol/mg).



**Abbildung 20: Messung fäkaler NOCs in WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21 und 162 Tagen.**

Die Tiere wurden mit Eisencitrat bzw. Häm-Eisen gefüttert und Stuhlproben an Tag 21 und 162 auf die Bildung fäkaler NOCs untersucht. Quantifizierung der NOCs, dargestellt als ATNCs, RSNOs, Fe-NOs und RNNOs von WT Tieren nach 21 (A) und 162 Tagen (B). Die Quantifizierung der MGMT<sup>-/-</sup> Tiere ist nach 21 Tagen in (C) und nach 162 Tagen in (D) dargestellt. Dargestellt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$ ) und die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

In Abb. 20 C sind die Ergebnisse der Messung fäkaler NOCs in MGMT-defekten Mäusen nach 21 Tagen Spezialdiäten dargestellt. Die Messung der ATNCs ergab keine Unterschiede zwischen der Menge, die nach Eisencitrat (ca. 590 pmol/mg Fäzes) und Häm-Eisen (ca. 600 pmol/mg Fäzes) gebildet wurde. Vergleichbar zum WT zeigten auch die MGMT-defekten Mäuse eine leichte Reduktion der fäkalen RSNOs nach Häm-Eisenfütterung (110 pmol/mg Fäzes) im Vergleich zu Eisencitrat (200 pmol/mg Fäzes). Betrachtet man die RNNOs, bewirkte Häm-Eisen einen signifikanten Anstieg von ca. 150 pmol/mg nach der Eisencitratdiät auf ca. 280 pmol/mg Fäzes. Die Menge der Fe-NOs stieg nach Häm-Eisenfütterung auf ca. das 1,5-fache der Eisencitratdiät.

In Abb. 20 D sind die Analysen der fäkalen NOCs nach 162 Tagen in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen dargestellt. Die Häm-Eisendiät bewirkte über den Langzeitversuch eine signifikante Induktion fäkaler ATNCs von ca. 240 pmol/mg Fäzes nach Eisencitrat auf ca. 620 pmol/mg

Fäzes. Dieser signifikante Anstieg nach Häm-Eisen spiegelte sich zudem sowohl in den Fe-NOs als auch den RNNOs wider. Die Eisencitratkontrolle induzierte eine mittlere Anzahl von 60 pmol Fe-NOs und 30 pmol RNNOs pro mg Fäzes, verglichen mit 140 pmol Fe-NOs und 460 pmol RNNOs pro mg Fäzes nach Häm-Eisen.

Die Ergebnisse der NOC-Analysen zeigten, dass eine Häm-Eisendiät in wildtypischen Mäusen nach 21 Tagen die endogene Bildung von NOCs (ATNCs und RNNOs) fördern kann. Dies wird durch den signifikanten Anstieg von RNNOs nach 162 Tagen Häm-Eisen bestätigt. In *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen bewirkte Häm-Eisen-angereichertes Futter bereits nach 21 Tagen eine signifikante Induktion der RNNOs, wobei nach einer Langzeitfütterung zusätzlich die Fe-NOs und damit auch die Gesamtnitrosoverbindungen (ATNCs) durch Häm-Eisen erhöht wurden.

Vergleicht man diese Ergebnisse der verschiedenen Genotypen miteinander ergaben, sich lediglich signifikante Unterschiede in der Bildung fäkaler Fe-NO nach Eisencitrat, die in *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen in einem geringeren Ausmaß nachgewiesen wurden. In den Stuhlproben der *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäuse waren generell nach 162 Tagen tendenziell weniger ATNCs, Fe-NOs und RNNOs bestimmbar, im Vergleich zu den Ergebnissen der Stuhlproben wildtypischer Mäuse (Abb. 56 siehe Anhang).

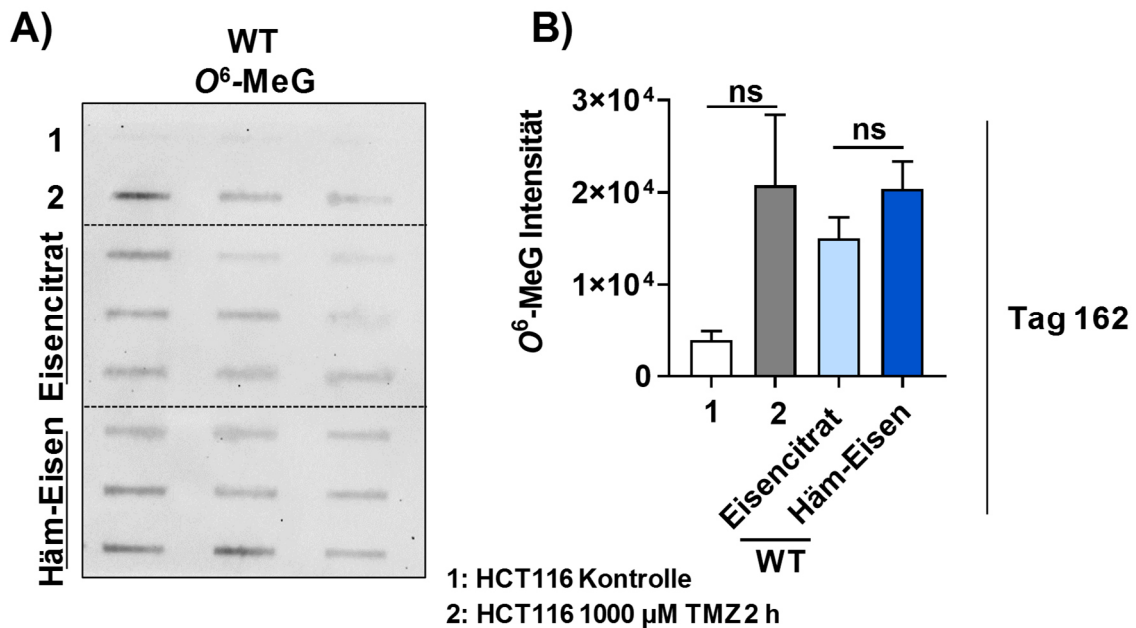
#### 4.3.2 Einfluss von Häm-Eisen auf die Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin im Kolon

Aufgrund der nachgewiesenen Bildung endogener NOCs durch Häm-Eisen in Fäzesproben wurde die potenzielle Induktion von O<sup>6</sup>-MeG im Kolonepithel untersucht. Die Bestimmung NOC-vermittelter DNA-Alkylierungsschäden v.a. O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen stellen eine wichtige Diagnostik in der Dickdarmkrebsentstehung dar (Kraus *et al.*, 2019). Diese O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen wurden im Kolongewebe, wie in 3.15 beschrieben, mittels Slot-Blot-Technik untersucht. Dazu wurde zunächst genomische DNA aus dem Kolonabschnitt C1 wildtypischer und *MGMT*-defekter Mäuse isoliert und schließlich die Häm-Eisen-induzierte DNA-Methylierung des Guanins an der Position O<sup>6</sup> unter Verwendung des spezifischen O<sup>6</sup>-MeG-Antikörpers untersucht (Kraus *et al.*, 2019).

Abb. 21 stellt die Analyse der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen in genomischer DNA des Kolongewebes von WT Mäusen nach 162 Tagen Spezialdiät dar. Als Positivkontrolle (2) wurden HCT116-Zellen 2 h mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-BG), einem *MGMT*-Inhibitor, vorbehandelt und anschließend 2 h mit 1000 µM Temozolomid (TMZ) inkubiert. Das alkylierende Zytostatikum TMZ zerfällt bei neutralem pH spontan in DNA-reaktive Methyl diazonium-Ionen, die O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen induzieren (Zhang *et al.*, 2012). Unbehandelte HCT116-Zellen dienten als Negativkontrolle (1). In Abb. 21 A ist ein repräsentativer Immuno-Slot-



Blot mit DNA, isoliert aus dem Kolon von WT Mäusen nach 162 Tagen Spezialdiät, zusammen mit den Zellkulturkontrollen dargestellt. Die quantitative Evaluation als absolute  $O^6$ -MeG-Intensität ist in Abb. 21 B visualisiert. Das  $O^6$ -MeG-Level der Kolon-DNA von Mäusen, die mit Häm-Eisen gefüttert wurden, wies im Vergleich zu denen der Kolon-DNA nach Eisencitratdiät einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg auf. Verglichen mit den Zellkulturkontrollen scheint die DNA aus murinem Kolongewebe bereits eine größere endogene  $O^6$ -MeG-Belastung vorzuweisen.



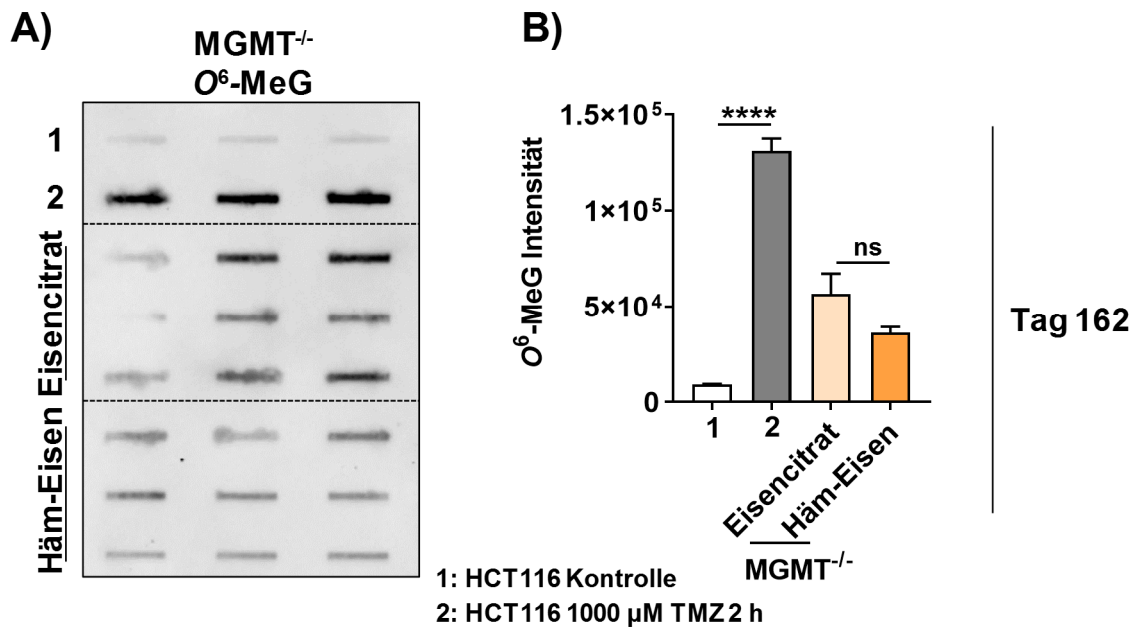
**Abbildung 21: Untersuchung der  $O^6$ -MeG-Läsionen in genomischer DNA von WT Mäusen.**

Die Tiere wurden mit Eisencitrat oder Häm-Eisen für 162 Tage gefüttert und  $O^6$ -MeG-Addukte in DNA aus Kolongewebe mittels Slot-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HCT116-Zellen (1) und als Positivkontrolle HCT116, die 2 h mit  $O^6$ -BG vorbehandelt und 2 h mit 1000  $\mu$ M TMZ (2) inkubiert wurden. A) Exemplarischer Immuno-Slot-Blot. B) Quantitative Evaluation der absoluten  $O^6$ -MeG-Intensitäten. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=3$ , je Triplikate) angegeben und die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \*\* $p<0,01$ .

Die Ergebnisse der Slot-Blot Analysen nach 162 Tagen Fütterung in  $MGMT^{-/-}$  Mäusen ist in Abb. 22 dargestellt. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede der  $O^6$ -MeG-Intensitäten in  $MGMT^{-/-}$  Mäusen nach den unterschiedlichen Diäten beobachtet. Die Häm-Eisendiät resultierte hier in einer leichten Abnahme der  $O^6$ -MeG-Addukte im Vergleich zur Eisencitratdiät (Abb. 22 B).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse des  $O^6$ -MeG-Slot-Blots weder in WT noch in  $MGMT^{-/-}$  Mäusen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diäten.





**Abbildung 22: Untersuchung der O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen in genomischer DNA von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Tiere wurden 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und die O<sup>6</sup>-MeG-Addukte im Kolongewebe mittels Slot-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HCT116-Zellen (1) und als Positivkontrolle dienten HCT116-Zellen, die 2 h mit O<sup>6</sup>-BG vorbehandelt und 2 h mit 1000 µM TMZ (2) inkubiert wurden. A) Exemplarischer Slot-Blot nach 162 Tagen Spezialdiät. B) Die quantitative Evaluation der O<sup>6</sup>-MeG-Intensitäten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=3, je Triplikate). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test. ns=nicht signifikant, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.4 Luminale Toxizität von Fäkalwasser nach Häm-Eisendiät

Die diätische Aufnahme von Häm-Eisen fördert die Bildung zytotoxischer Verbindungen in Fäzes (Awasthi *et al.*, 2003; Leuratti *et al.*, 2002; Schaeferhenrich *et al.*, 2003). Hier wurde das zytotoxische Potenzial von Fäkalwasser wildtypischer und MGMT-defekter Mäuse nach 21 Tagen Spezialdiät auf humane Kolonepithelzellen (HCEC, HCT116) untersucht. Die Analysen des Fäkalwassers wurden von [REDACTED] durchgeführt (Abschnitt 3.17).

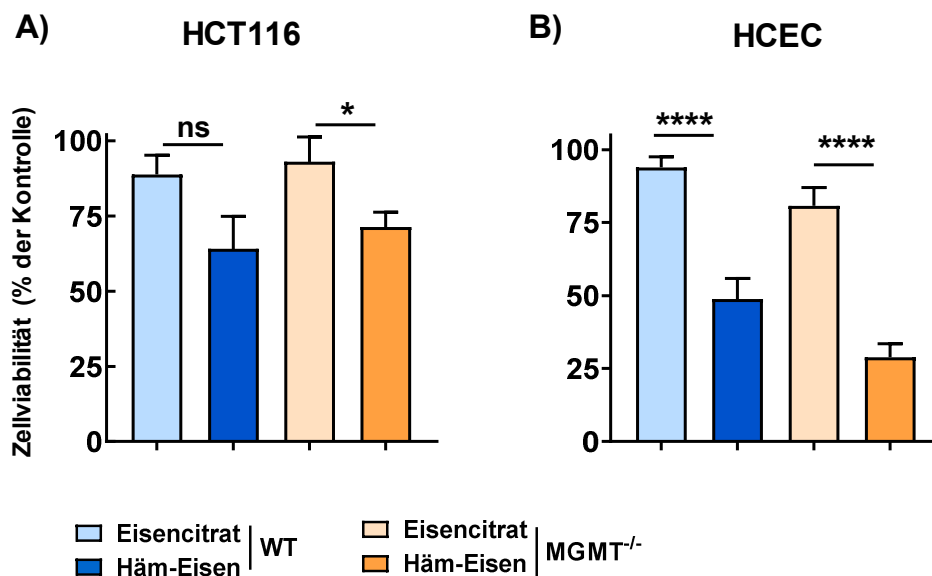
Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der Behandlung von HCT116-Zellen (A) bzw. HCEC (B) für 24 h mit dem Fäkalwasser von Mäusen nach 21 Tagen Diät. Die Zellviabilität wurde mithilfe eines ATP-Assays quantifiziert (3.17.3). Eine Lösungsmittelkontrolle wurde als Referenz mitgeführt, diese auf 100 % gesetzt und die Proben darauf relativiert (Lösungsmittelkontrolle ist nicht dargestellt).

Die Behandlung der humanen Kolontumor-Zelllinie HCT116 mit dem Fäkalwasser wildtypischer Tiere nach 21 Tagen Eisencitrat resultierte in einer Zellviabilität von ca. 88,8 % (Abb. 23 A). Nach der Inkubation der HCT116-Zellen mit dem Fäkalwasser der WT Tiere nach Häm-Eisen reduzierte sich die Zellviabilität nicht signifikant auf knapp 64 %. Das Fäkalwasser der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse nach Eisencitrat bedingte in den HCT116-Zellen eine

durchschnittliche Zellviabilität von 93 %, die nach der Behandlung mit dem Fäkalwasser nach Häm-Eisen signifikant auf eine mittlere Zellviabilität von 71,3 % sank.

In Abb. 23 B sind die Ergebnisse der Behandlung nicht-maligner HCEC mit dem Fäkalwasser wildtypischer und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse dargestellt. Die Behandlung mit dem Fäkalwasser aus WT Mäusen nach einer Eisencitratdiät resultierte in einer geringen Erniedrigung der Zellviabilität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die Zellviabilität der HCEC sank durch die Behandlung mit Fäkalwasser von Häm-gefütterten WT Mäusen signifikant auf ca. 49 %. Die Inkubation der HCEC mit Fäkalwasser der MGMT-defekten Tiere zeigte nach Eisencitrat eine Reduktion der Viabilität auf ca. 80,8 %, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Das Fäkalwasser der MGMT-defekten Mäuse nach Häm-Eisenfütterung bewirkte eine signifikante Abnahme der Zellviabilität auf ca. 29 %.

Interessanterweise zeigten nicht-maligne Kolonozyten (HCEC) eine höhere Anfälligkeit gegenüber einer Häm-Eisen-vermittelten Zytotoxizität als die Darmkrebszellen (HCT116). Vergleicht man die Ergebnisse der Fäkalwasserzytotoxizitätsassays zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup>, so konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede dokumentiert werden (Abb. 57 siehe Anhang).



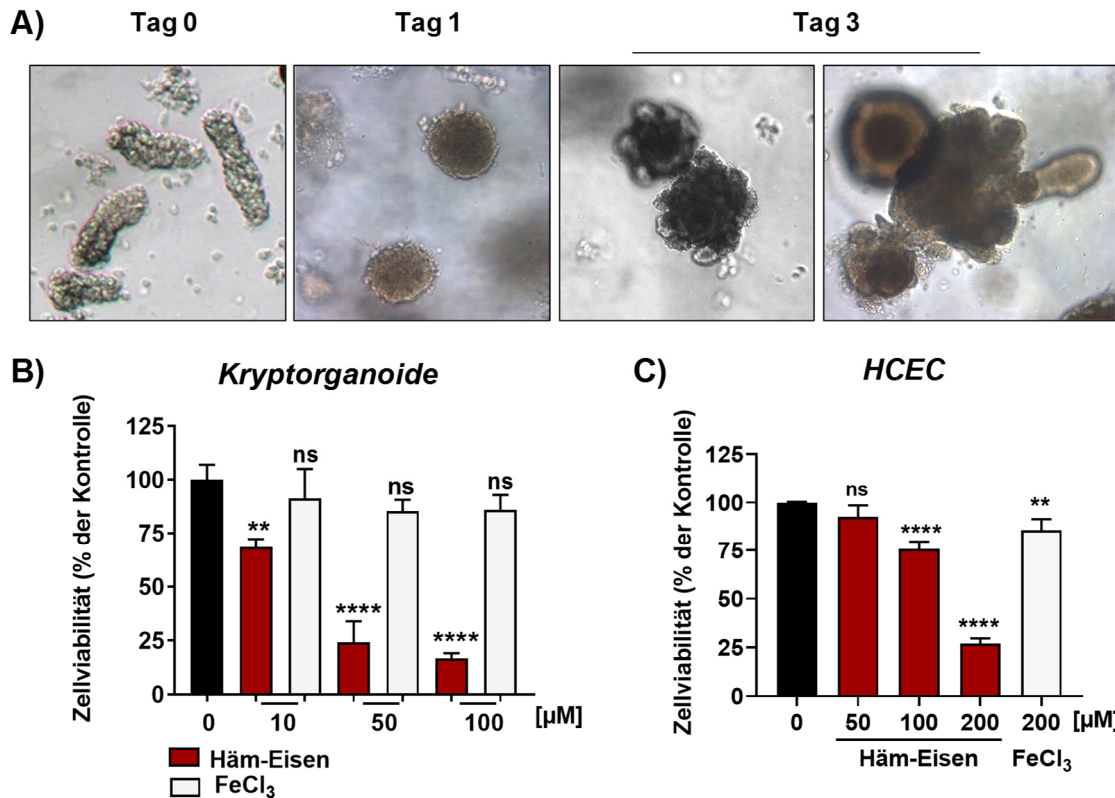
**Abbildung 23: Häm-Eisen-induzierte Fäkalwasserzytotoxizität in Kolonepithelzellen.**

Behandlung von HCEC mit dem Fäkalwasser nach 21 Tagen Fütterung von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM (n $\geq$ 11). Die statistische Auswertung der Zellviabilität bezogen auf eine Lösungsmittelkontrolle mittels *Student's t-Test*. \*\*\*\*p<0,0001.

Des Weiteren wurde die Häm-Eisen-induzierte Zytotoxizität auf intestinale Kryptorganoide (Abb. 24 A und B) und HCEC (Abb. 24 C) untersucht. Dazu wurden die Krypten, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, isoliert und nach 3 Tagen Differenzierung für 24 h mit anorganischem ( $\text{FeCl}_3$ ) bzw. Häm-Eisen (in der Form von Hämin) behandelt. In Abb. 24 A sind repräsentative Aufnahmen der Krypten und deren Differenzierung zu Organoiden dargestellt. Bei Isolation (Tag 0) wiesen die Krypten eine typische längliche Form auf, die an Tag 1 verschwand. Die Krypten entwickelten mit der Zeit eine rundliche Morphologie und es wurde ein Anschwellen der Organoide beobachtet. Eine sukzessive Entwicklung von Ausstülpungen begann an Tag 1 und war an Tag 3 deutlich erkennbar. In diesem Stadium wurden die Zellen mit Häm-Eisen oder  $\text{FeCl}_3$ , welches als anorganische Eisenkontrolle diente, für 24 h behandelt. Unbehandelte intestinale Organoide dienten als Kontrolle und wurden auf 100 % Viabilität normiert. Bereits die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Häm-Eisen bewirkte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität auf ca. 68 %, die nach der Behandlung mit höheren Häm-Konzentrationen in einem verstärkten Ausmaß dosisabhängig beobachtet wurde. Die Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Häm-Eisen reduzierte die Viabilität der Krypten signifikant auf ca. 24 % und 100  $\mu\text{M}$  auf ca. 17 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen an  $\text{FeCl}_3$  ergab keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Abb. 24 B).

Zur Analyse der Empfindlichkeit nicht-maligner humaner Kolonepithelzellen auf die Behandlung mit Häm-Eisen wurden HCEC 72 h mit steigenden Häm-Dosen (Hämin) oder  $\text{FeCl}_3$  (200  $\mu\text{M}$ ) inkubiert (Abb. 24 C). Anschließend erfolgte die Zellviabilitätsmessung mithilfe eines MTS-Assays, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. Die Inkubation der HCEC mit steigenden Häm-Eisendosen resultierte in einer dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität. Während die Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  keine signifikante Änderung induzierte, reduzierten 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  die Zellviabilität signifikant auf 75,6 % bzw. 27 %. Nach Behandlung mit der anorganischen Eisenkontrolle ( $\text{FeCl}_3$ ) wurde eine signifikant reduzierte Zellviabilität von ca. 85,7 % gemessen.

Zusammengefasst wurde dokumentiert, dass nach Behandlung mit dem Fäkalwasser nach Häm-Eisendiät bzw. der direkten Behandlung mit Häm-Eisen eine verstärkte Zytotoxizität beobachtet wurde, die v.a. nicht-maligne Kolonepithelzellen (HCEC) und Kryptorganoide negativ beeinflusst. Hierbei zeigten die Kryptorganoide die stärkste Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Häm-Eisen.



**Abbildung 24: Häm-Eisen-induzierte Zytotoxizität in intestinalen Organoiden und Kolonepithelzellen.**

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Differenzierung von intestinalen Kryptorganoiden. B) Quantifizierung der Zellviabilität von Kryptorganoiden 24 h nach Inkubation mit anorganischem Eisen (FeCl<sub>3</sub>) oder Häm-Eisen (Hämin) relativiert auf eine unbehandelte Kontrolle (100 %). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2, Triplikate) werden dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001. C) Behandlung von HCEC mit steigenden Dosen Häm-Eisen oder FeCl<sub>3</sub> (200 µM) für 72 h. Messung der Zellviabilität mittels MTS-Assay. Zellviabilität normiert auf unbehandelte Kontrollzellen. Die Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n $\geq$ 2, Triplikate) dargestellt und die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

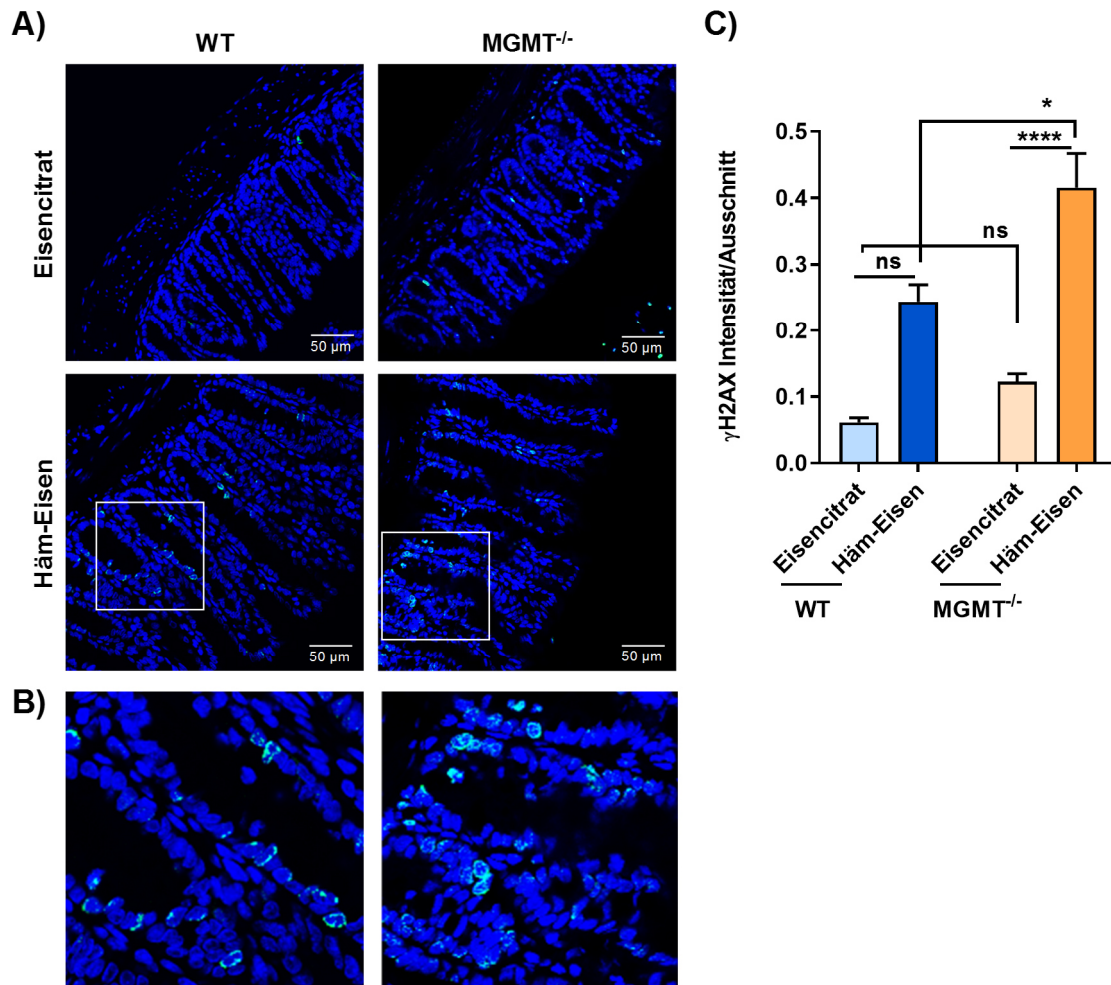
## 4.5 DNA-Schadensinduktion nach Häm-Eisen-Fütterung

### 4.5.1 Nachweis von DNA-Schäden im Kolonepithel mittels Immunhistochemie

Um weitere DNA-schädigende Eigenschaften einer Häm-Eisendiät im Kolon von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nachzuweisen, wurden Kolonschnitte, wie in Kapitel 3.12 beschrieben, immunhistologisch mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX gefärbt.  $\gamma$ H2AX ist ein bedeutender und etablierter DNA-Strangbruchmarker (Fahrer *et al.*, 2015; Kuo *et al.*, 2008).

In Abb. 25 sind die Ergebnisse der  $\gamma$ H2AX-Färbung nach 21 Tagen Fütterung in beiden Genotypen dargestellt. Die Abb. 25 A zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Eisencitrat- und Häm-Eisenfütterung. Während luminal wenig bis gar keine Signale zu sehen sind, treten in den basalen Kolonkrypten und in den mittleren Epithelabschnitten  $\gamma$ H2AX-positive Zellen auf. In Abb. 25 B sind die Vergrößerungen der in 25 A abgebildeten  $\gamma$ H2AX-Färbungen nach Häm-Eisen dargestellt. Die statistische

Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Intensität pro Bildausschnitt ist in 25 C graphisch abgebildet. Das Kolonepithel wildtypischer Mäuse wies nach einer 21-tägigen Eisencitratdiät eine Intensität von ca. 0,06 pro Bildausschnitt auf, welche nach Häm-Eisen auf einen mittleren Wert von 0,24 anstieg. Eine ähnliche Häm-Eisen-vermittelte Induktion der  $\gamma$ H2AX-Foci wurde auch im Kolon MGMT-defekter Mäuse beobachtet. Die Häm-Eisendiät bewirkte hier einen signifikanten Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Intensität auf durchschnittlich 0,42, verglichen mit der Intensität nach Eisencitrat (ca. 0,12).



**Abbildung 25: IHC-Analyse von  $\gamma$ H2AX im Kolonepithel beider Genotypen nach 21 Tagen Diät.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und das Kolongewebe immunhistochemisch auf die Induktion von  $\gamma$ H2AX analysiert. A) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbung. Die Aufnahmen wurden bei einer 40x Vergrößerung und einem digitalen Zoom von 0,6 aufgenommen. Die Zellkerne sind in Blau (TO-PRO3) und das  $\gamma$ H2AX-Signal in Grün dargestellt. B) Vergrößerungsausschnitte der markierten Abschnitte nach Häm-Eisen. C) Statistische Evaluation von A) mittels zweiseitigem ANOVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, je 6-10 Aufnahmen). ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001.

Ein Vergleich der beiden Genotypen nach den unterschiedlichen Diäten ergab ein basal leicht, aber nicht signifikant erhöhtes  $\gamma$ H2AX-Level in den Eisencitrat-gefütterten MGMT-

defekten Mäusen im Vergleich zum WT. Vergleicht man die Ergebnisse nach Häm-Eisen, zeigten sich in den MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant mehr γH2AX-Signale als im WT.

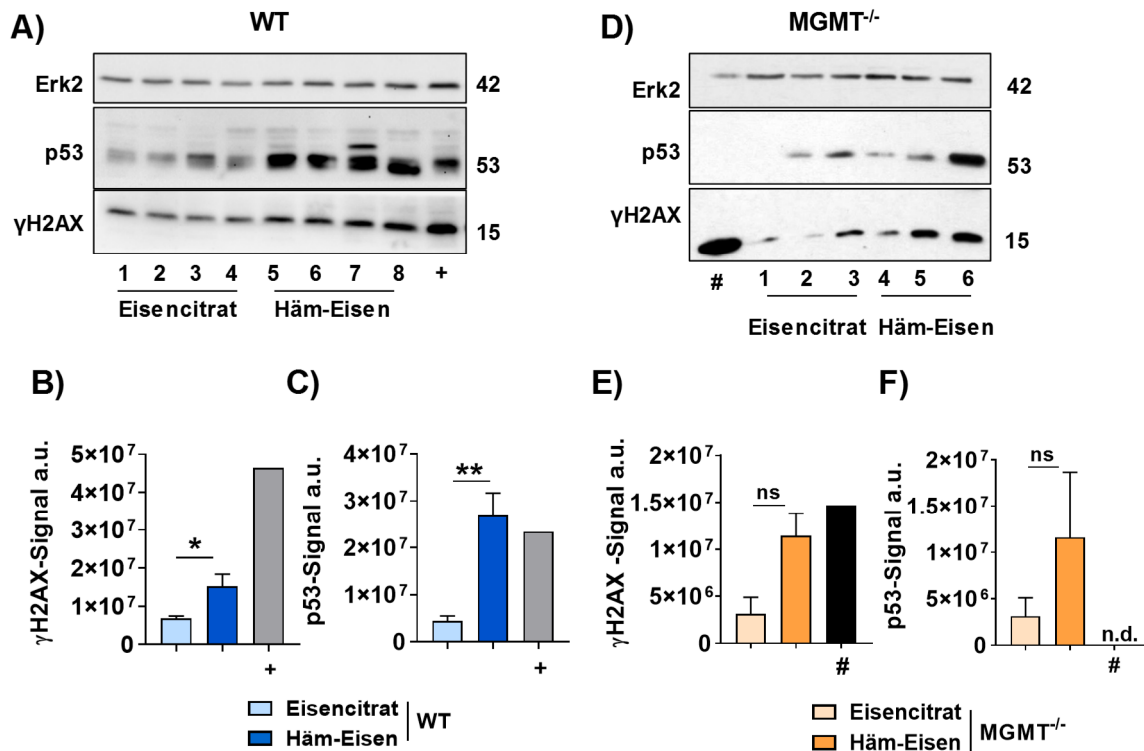
### 4.5.2 Nachweis von DNA-Schäden nach Häm-Eisen mittels Western Blot

Die IHC-Analysen von γH2AX nach 21 Tagen Spezialdiäten wurden mittels Western Blot Technik verifiziert. Dazu wurden RIPA-Proteinlysate, wie in Abschnitt 3.14 beschrieben, hergestellt, die Proteine mithilfe einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Induktion von γH2AX mittels Western Blot untersucht. Zusätzlich wurde die Häm-Eisen-vermittelte Induktion von p53 ermittelt. P53 spielt eine zentrale Rolle in der DNA-Schadensantwort und kann u.a. über die γH2AX-ATM-Achse aktiviert werden (Canman *et al.*, 1998; Meek, 2009). Zudem wurde in früheren Publikationen eine Stabilisierung von p53 im murinen Kolonepithel nach der Behandlung mit DNA-alkylierenden Agenzien beobachtet (Fahrer *et al.*, 2015).

Abb. 26 zeigt repräsentative Western Blots nach 21 Tagen Fütterungsexperiment von WT und MGMT-defekten Mäusen, sowie deren quantitative Auswertung. Die Western Blot Analyse der Proteinlysate von WT-Mäusen ist in Abb. 26 A dargestellt. Als Ladekontrolle wurde Erk2 detektiert. Zur Quantifizierung wurden die γH2AX- und p53-Signale auf die jeweiligen Erk2-Proteinlevel relativiert. Die Analyse der Proteinsignale ergab sowohl in Hinblick auf γH2AX (Abb. 26 B) als auch auf p53 (Abb. 26 C) eine signifikante Induktion nach Häm-Eisendiät. Als Positivkontrolle wurden Gewebelysate von Kolonproben aus MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach einer initialen AOM-Injektion (3 mg/kg KG) und einem DSS Zyklus (1 % DSS) verwendet (Dörsam, 2016)

Der in Abb. 26 D abgebildete Western Blot mit Proteinlysaten aus dem Kolongewebe der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden hier Mausfibroblasten (SA-3T3) 4 h mit 5 μM des Zytostatikums Etoposid inkubiert. Erk2 wurde als Ladekontrolle verwendet (Zillmer, 2017). Die Quantifizierung der γH2AX-Proteinbanden ließ nach Häm-Eisen einen nicht signifikanten Anstieg des Proteinlevels, verglichen mit Eisencitrat, erkennen (Abb. 26 E). Dies traf auch auf die p53-Proteinlevel zu, die nach Häm-Eisen erhöht vorlagen (Abb. 26 F). Aufgrund der hohen Schwankungen innerhalb des Experiments konnten keine Signifikanzen festgestellt werden.





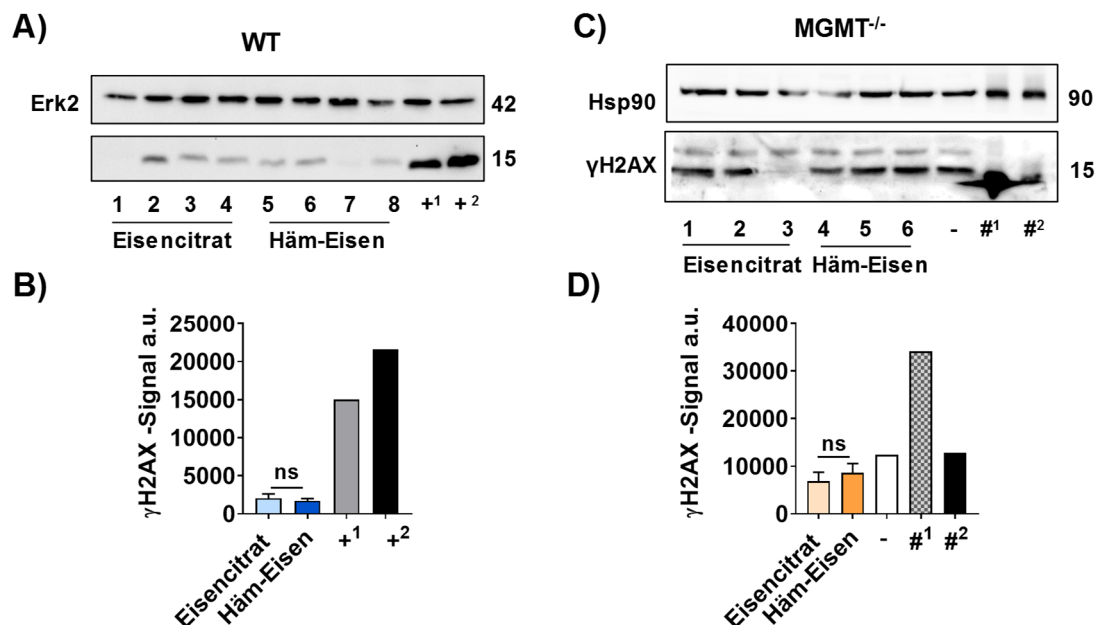
**Abbildung 26: Western Blot Analyse von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21 Tagen Fütterung.**

Die Tiere wurden mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Proteinlysate aus Kolongewebe wurden mittels SDS-PAGE (15 %) und Western Blot Analyse untersucht. Exemplarische Western Blots von WT (A) und MGMT-defekten (D) Mäusen. (B, C, E, F) Quantitative Auswertung der Proteinbanden der Western Blots aus A und D. +: Positivkontrolle aus Kolongewebe MGMT-defekter Mäuse nach AOM-Injektion (3 mg AOM) und einem DSS-Zyklus (1 %). #: Positivkontrolle aus SA-3T3-Zellen 4 h mit 5  $\mu$ M Etoposid behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3-4, Positivkontrolle n=1), die statistisch mittels *Student's t-Test* ausgewertet wurden. n.d.=nicht detektierbar. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Der immunhistochemisch ermittelte Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Level nach 21 Tagen Häm-Eisen konnte mithilfe der Western Blot Analysen in beiden Genotypen bestätigt werden. In den WT Mäusen ergaben die Western Blot Ergebnisse einen signifikanten Anstieg von  $\gamma$ H2AX nach Häm-Eisen, der sich in MGMT<sup>-/-</sup> Tieren als nicht signifikanter Anstieg zeigte. Zusätzlich wurde nach 21 Tagen eine deutliche Häm-Eisen-vermittelte Stabilisierung von p53 beobachtet, die auf die Aktivierung der DNA-Schadensantwort (DNA *damage response*, DDR) hindeuten.

Abb. 27 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analysen nach 162 Tagen Diät in beiden Genotypen. Hier wurden, wie in Abschnitt 3.14 beschrieben, jeweils der Kolonabschnitt C2 verwendet und RIPA-Lysate hergestellt. Die Induktion von  $\gamma$ H2AX im Kolon der WT Tiere ist in einem exemplarischen Western Blot in Abb. 27 A dargestellt. Als Positivkontrollen wurden Gewebelysate von Kolonproben aus MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach einer initialen AOM-Injektion (3 mg/kg KG) und einem DSS-Zyklus (1 % DSS) verwendet (+<sup>1</sup>) (Dörsam, 2016). Zudem dienten Proteinlysate aus dem Kolongewebe von MGMT<sup>-/-</sup>-AAG<sup>-/-</sup> Mäusen, die 24 h mit 10 mg AOM (+<sup>2</sup>) behandelt wurden, als weitere Positivkontrolle (Frisch, 2013). Als

Ladekontrolle wurde Erk2 detektiert. In Abb. 27 B ist die Normierung des  $\gamma$ H2AX-Signals auf das jeweilige Erk2-Signal dargestellt. Nach 162 Tagen Häm-Eisen wurden keine signifikanten Unterschiede im Kolongewebe von WT Mäusen beobachtet. Abb. 27 C zeigt einen repräsentativen Western Blot der MGMT-defekten Tiere hinsichtlich der  $\gamma$ H2AX-Induktion. Hier wurde Hsp90 als Ladekontrolle detektiert. Murine Fibroblasten (SA-3T3), die 4 h mit 5  $\mu$ M Etoposid (#<sup>1</sup>) behandelt oder mit 10 Gy bestrahlt und für 30 min inkubiert (#<sup>2</sup>) (Zillmer, 2017) wurden, dienten als Positivkontrollen. Zusätzlich wurden Proteinlysate von unbehandelten WT Mäusen (-) aufgetragen. Die quantifizierten und auf die Hsp90-Signale normierten  $\gamma$ H2AX-Proteinbanden sind in Abb. 27 D dargestellt und zeigten nach Häm-Eisen keinen Anstieg von der  $\gamma$ H2AX Proteinmenge. Das  $\gamma$ H2AX-Level war vergleichbar mit dem Proteinlevel der unbehandelten WT-Probe (-).



**Abbildung 27: Western Blot Analyse von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 162 Tagen Fütterung.**

Die Tiere wurden mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die Proteine wurden als RIPA-Lysate aus dem Kolongewebe hergestellt und mittels SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt. Exemplarische Western Blots von WT (A) und MGMT-defekten (C) Mäusen. (B, D) Quantitative Auswertung der Proteinbanden der Western Blots aus (A) und (C), bezogen auf die jeweilige Ladekontrolle. +<sup>1</sup>: Positivkontrolle aus Kolongewebe MGMT-defekter Mäuse nach AOM-Injektion (3 mg/kg KG) und einem DSS-Zyklus (1 %). +<sup>2</sup>: Positivkontrolle aus Kolongewebe von MGMT<sup>-/-</sup>/AAG<sup>-/-</sup> Mäusen nach 24 h AOM (10 mg/kg KG). #<sup>1</sup>: Positivkontrolle aus SA-3T3-Zellen 4 h mit 5  $\mu$ M Etoposid, #<sup>2</sup>: Positivkontrolle aus SA-3T3-Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 30 min inkubiert. -: Kolongewebe einer unbehandelten WT Maus. Statistisch wurden die Daten mittels *Student's t-Test* ausgewertet und dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3-4). ns=nicht signifikant.

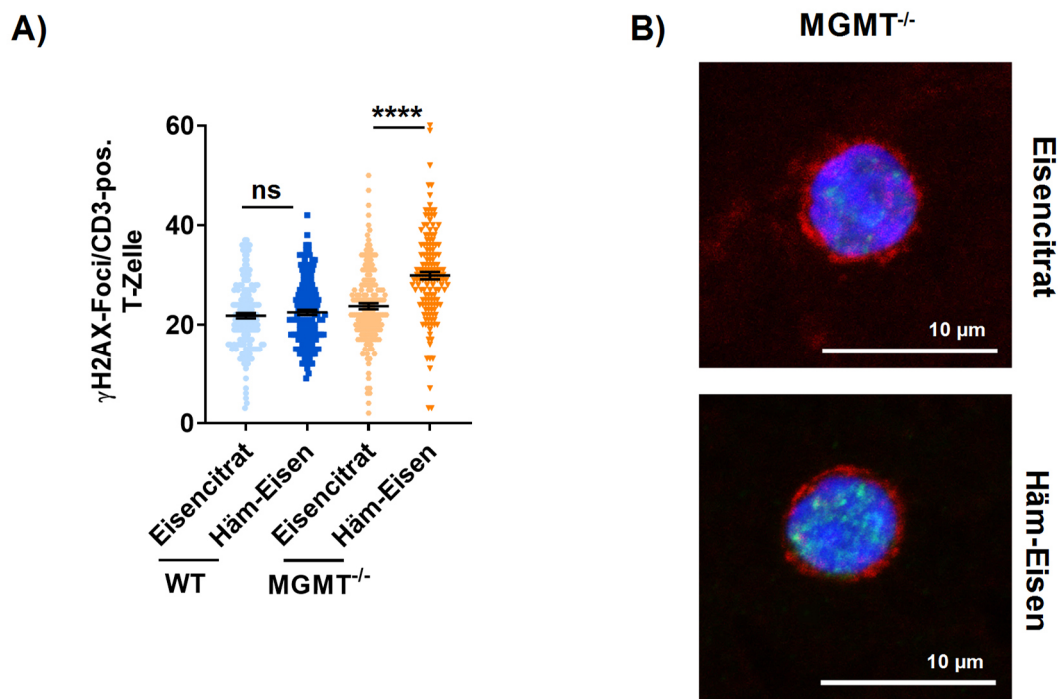
#### 4.5.3 Häm-induzierte DNA-Schäden in peripheren Blutzellen

Die Aktivierung von T-Zellen spielt eine essentielle Rolle in der zellulären Immunantwort durch die Abwehr von Infektionen und malign-transformierter Zellen (Heylmann *et al.*, 2016; Shiao *et al.*, 2011). Um nachzuweisen, ob eine 21-tägige Häm-Eisendiät DNA-



Schäden in CD3-positiven T-Zellen in Blutzellen induziert, wurde peripheres Blut von beiden Genotypen mittels BDM analysiert (3.7.1 (Heylmann *et al.*, 2016)).

Abb. 28 repräsentiert die Ergebnisse der BDM bezüglich Häm-Eisen-induzierter  $\gamma$ H2AX-Foci in peripheren CD3-positiven T-Zellen. Sowohl nach Eisencitrat- als auch nach Häm-Eisenfütterung konnten in WT-Mäusen im Schnitt 22-23  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positiver T-Zelle nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bewirkte die Häm-Eisendiät in  $MGMT^{-/-}$  Mäusen einen signifikanten Anstieg von ca. 24 nach Eisencitrat auf 30  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positiver T-Zelle (Abb. 28 A). Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Foci CD3-positiven T-Zellen aus dem Blut von  $MGMT^{-/-}$  Mäusen nach den Spezialdiäten sind in Abb. 28 B dargestellt.



**Abbildung 28: Untersuchung der DNA-Schäden in peripheren T-Lymphozyten**

Die WT und  $MGMT^{-/-}$  Mäuse wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und das Blut mittels BDM auf  $\gamma$ H2AX-Foci in T-Zellen analysiert. A) Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positive (pos.) T-Zelle. Dargestellt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ , je 12-15 verschiedene Aufnahmen). Statistische Auswertung erfolgte mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant, \*\*\*\* $p < 0,0001$ . B) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (z-stack) der  $\gamma$ H2AX-Färbung von peripheren CD3-pos. T-Zellen aus  $MGMT^{-/-}$  Mäusen nach beiden Diäten. In Blau sind die Zellkerne (TO-PRO3) und in Grün  $\gamma$ H2AX dargestellt. Der T-Zellrezeptor CD3 ist rot gefärbt.

Der Vergleich der  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positiver T-Zelle zwischen  $MGMT$ -profizienten (WT) und -defizienten ( $MGMT^{-/-}$ ) Mäusen nach den Spezialdiäten ergab ein leicht erhöhtes, aber nicht signifikantes basales  $\gamma$ H2AX-Level in den  $MGMT^{-/-}$  Mäusen, welches nach der Häm-Eisendiät in einer signifikanten Induktion der  $\gamma$ H2AX-Foci resultierte (Abb. 59 siehe Anhang).

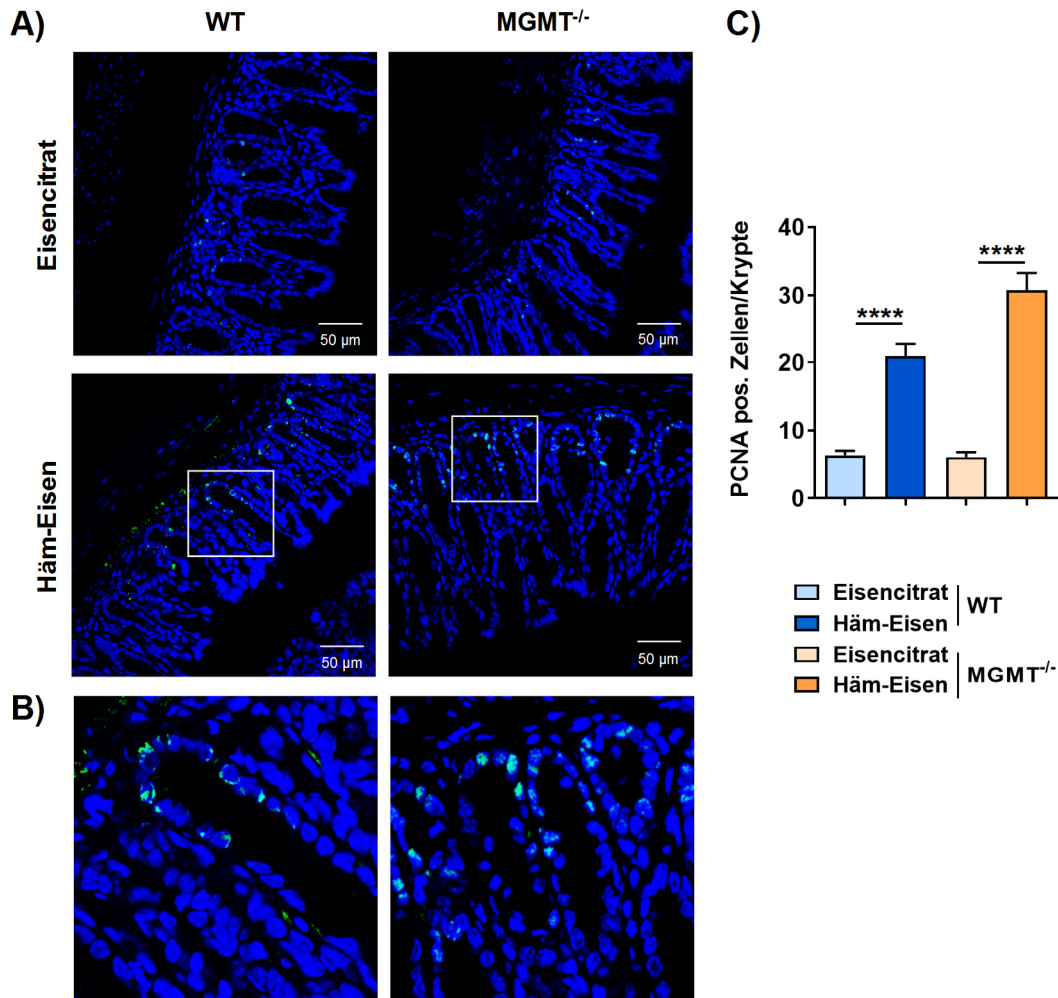
#### 4.6 Häm-Eisen-vermittelte Steigerung der intestinalen Proliferation

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob diätisches Häm-Eisen die Proliferation im Dickdarmepithel beeinflusst. Dazu wurden WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse 21 Tage mit den Spezialdiäten gefüttert und das in Paraffin eingebettete Kolongewebe anschließend immunhistochemisch mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)-Antikörper gefärbt (3.12).

In Abb. 29 ist die PCNA-Färbung von Kolonschnitten beider Genotypen dargestellt. Abb. 29 A zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen dieser Kolonschnitte. Erkennbar ist eine eher basale Lokalisierung des Fluoreszenzsignals nach Häm-Eisen, die eine Häm-Eisen-induzierte Proliferationssteigerung innerhalb der Kolonkrypten repräsentieren könnte. In Abb. 29 B sind vergrößerte Ausschnitte der PCNA-Färbung nach Häm-Eisen abgebildet. Hier wird die nukleare Lokalisierung von PCNA sichtbar. Das Signal wurde zudem am Rand des Zellkerns beobachtet. Die Quantifizierung der PCNA-Färbung als PCNA-positive Zellen pro Krypte verdeutlicht die Häm-Eisen-vermittelte Hyperproliferation des Kolonepithels (Abb. 29 C). Im Kolon wildtypischer Mäuse stieg nach Häm-Eisen die durchschnittliche Anzahl PCNA-positiver Zellen signifikant auf 23, verglichen mit 6 positiven Zellen im Kolon von Eisencitrat-gefütterten Mäusen.

Im Kolonepithel der MGMT-defizienten Mäuse ist das Level der PCNA-positiven Zellen nach Eisencitrat mit ca. 6 vergleichbar zu dem Kontrolllevel der WT Tiere. Auch hier induziert Häm-Eisen nach 21 Tagen einen signifikanten Anstieg auf durchschnittlich 32 PCNA-positive Zellen.

Während nach Eisencitratdiät im Kolonepithel beider Genotypen eine vergleichbare Anzahl PCNA-positiver Zellen dokumentiert wurde, konnte nach Häm-Eisen eine signifikant erhöhte Zahl im Kolonepithel der MGMT-defekten Mäuse ermittelt werden (Abb. 58 A siehe Anhang). Folglich scheint diätisches Häm-Eisen zu einer gesteigerten Proliferation im Kolonepithel der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse, verglichen mit dem WT, zu führen.



**Abbildung 29: IHC-Färbung von PCNA im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Mäuse erhielten 21 Tage Eisencitrat oder Häm-Eisen mit anschließender Analyse des Proliferationsmarkers PCNA. A) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der PCNA-Färbung aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung und einem digitalen Zoom von 0,6 und in B) deren Vergrößerungen nach Häm-Eisen. Zellkerne sind in Blau (TO-PRO3) und PCNA in Grün dargestellt. C) Statistische Auswertung als PCNA-positive (pos.) Zellen pro Krypte, bei der die Werte als Mittelwert ± SEM (n≥5, je 6-10 Ausschnitte) dargestellt sind, erfolgte mittels *Student's t-Test* ermittelt. \*\*\*\*p<0,0001.

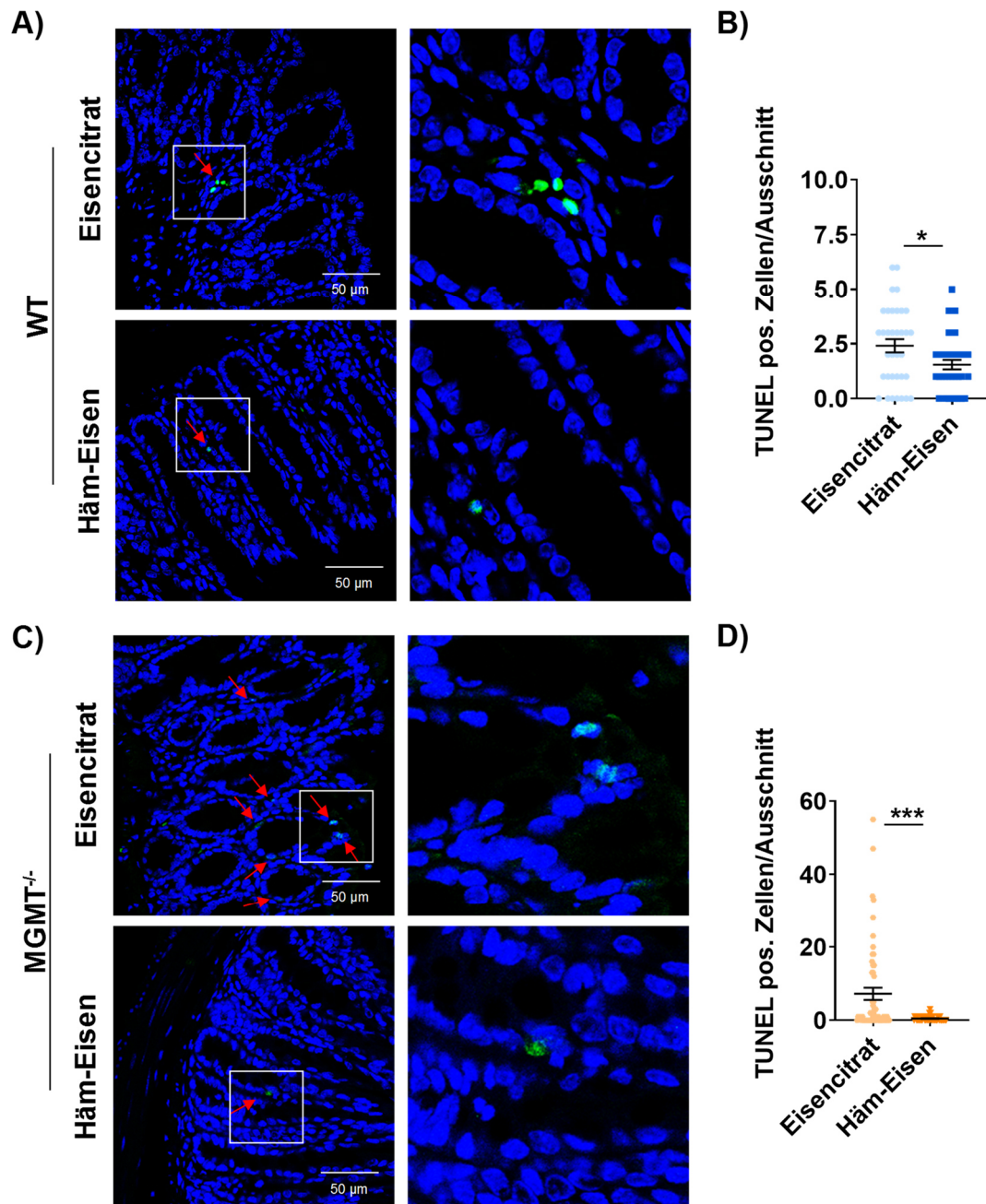
Histopathologische Analysen des Kolonepithels wurden von [REDACTED]

[REDACTED] durchgeführt und deuten nach 21-tägiger Häm-Eisendiät auf eine erhöhte Anzahl mitotischer Figuren hin (Abb. 53 A siehe Anhang), die ein Marker für eine gesteigerte proliferative Aktivität sind (Erben *et al.*, 2014).

#### 4.7 Häm-Eisen hemmt die Apoptose-Induktion im Kolonepithel

Des Weiteren wurde das Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Tieren nach 21 Tagen Fütterung auf die Induktion des apoptotischen Zelltods untersucht. Dazu wurden die Tiere mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und die Apoptose mittels TUNEL-Assay, bei dem die freien DNA-Enden apoptotischer Zellen markiert werden, im Kolonepithel analysiert (3.12.2). Abb. 30 zeigt die Ergebnisse der IHC-basierten TUNEL-Färbung. Repräsentative

Aufnahmen von Kolonschnitten aus WT und *MGMT*<sup>-/-</sup> Tieren nach Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät sind in Abb. 30 A (WT) und C (*MGMT*<sup>-/-</sup>) dargestellt.



**Abbildung 30: Messung der Apoptose-Induktion im Kolonepithel von WT und *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Tiere erhielten 21 Tage diätisches Eisencitrat bzw. Häm-Eisen. Kolonschnitte wurden mittels TUNEL-Assay analysiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der TUNEL-Färbung von WT (A) und *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen (C) aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung und einem digitalen Zoom von 0,6. Zellkerne werden in Blau (TO-PRO3) und apoptotische Zellen (TUNEL) in Grün dargestellt. Rote Pfeile zeigen TUNEL-positive Zellen. Quantifizierung TUNEL-positiver (pos.) Zellen von WT (B) und *MGMT*<sup>-/-</sup> (D), die als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ , je 6-10 Ausschnitte) dargestellt sind und deren statistische Auswertung mittels *Student's t-Test* erfolgte. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

TUNEL-positive Zellen wurden im gesamten Kolonepithel beobachtet und mit roten Pfeilen gekennzeichnet. In den vergrößerten Bildausschnitten (weiße Quadrate) erkennt man eine

nukleare Lokalisierung des Signals. Die statistische Auswertung der TUNEL-positiven Zellen im Kolonepithel wildtypischer Mäuse ist im Abb. 30 B visualisiert. Hier wurden nach Eisencitrat durchschnittlich 2,4 positive Zellen, nach Häm-Eisen eine signifikante Reduktion auf ca. 1,6 positive Zellen pro Bildausschnitt dokumentiert. Im Kolonepithel MGMT-defizienter Mäuse wurden nach Eisencitrat durchschnittlich 8,3 TUNEL-positive Zellen pro Bildausschnitt analysiert, wobei die Anzahl nach Häm-Eisen signifikant auf einen mittleren Wert von 0,8 abnimmt (Abb. 30 D).

Das Kolonepithel MGMT-defizienter Mäuse wies bereits nach der Eisencitratkontrolldiät ein signifikant erhöhtes basales Level an TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zum WT auf. Häm-Eisen bewirkte in den MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen eine nicht signifikante Reduktion der TUNEL-positiven Zellen, verglichen mit den Häm-gefütterten WT Mäusen (Abb. 58 B siehe Anhang).

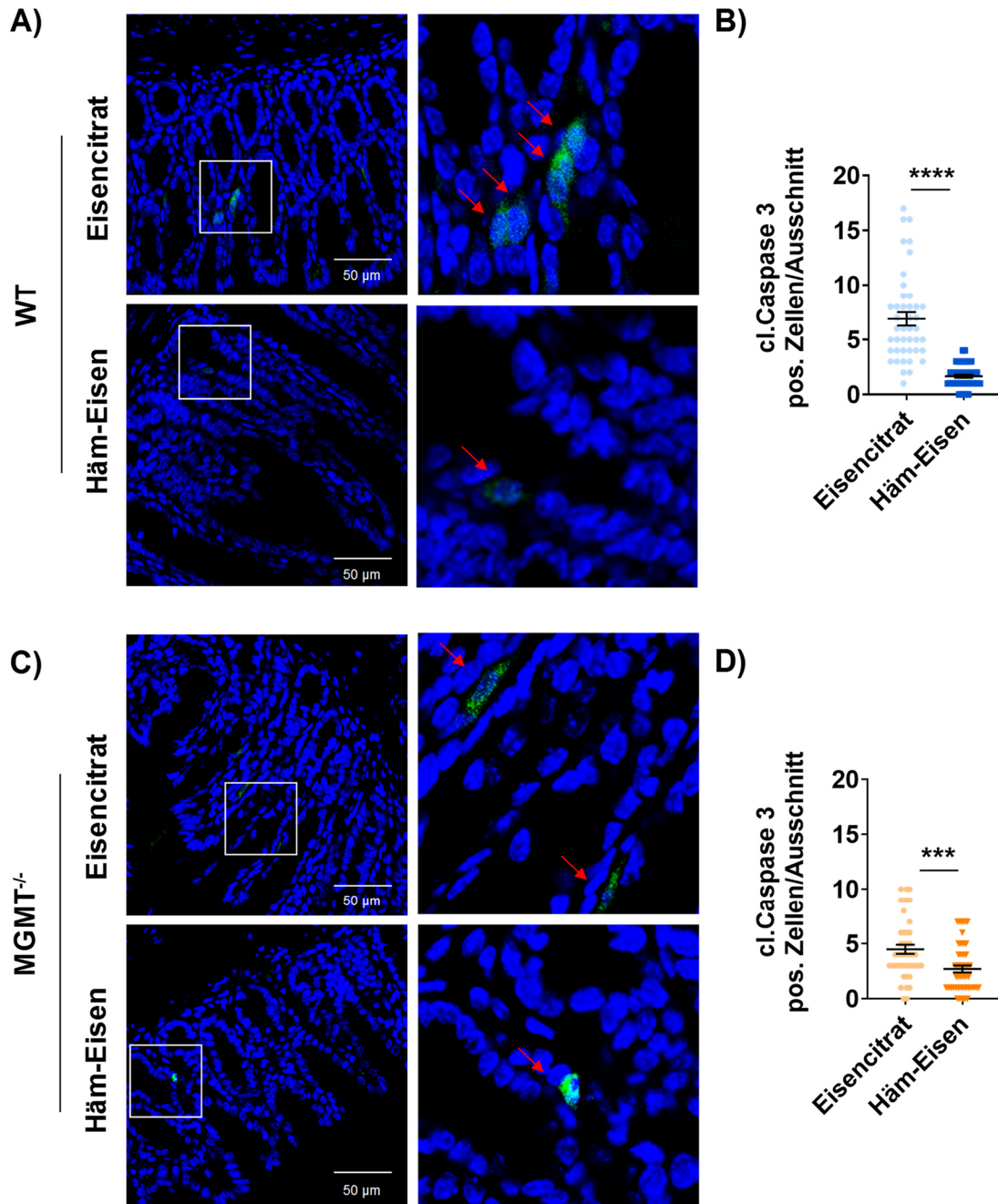
Zusätzlich wurde die Apoptose mithilfe einer weiteren IHC-Färbung bestimmt, die die Spaltung der Caspase 3 (*cleaved* Caspase 3) untersucht. Die Spaltung dieser Caspase stellt ein Schlüsselereignis der Apoptose-Induktion dar. Caspase 3 zählt zu den Effektorcaspasen und ist die am häufigsten aktivierte Protease des apoptischen Zelltods (Porter *et al.*, 1999). Sie wird durch die Cytochrom C-Freisetzung und die Spaltung durch die Initiatorcaspase 9 veranlasst (Porter *et al.*, 1999). Caspase 3 spielt eine zentrale Rolle im apoptotischen Zelltod und ist u.a. verantwortlich für die Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und die Bildung apoptotischer Körper. Caspase 3 spaltet den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNasen (ICAD) DFF-45, wodurch die Hemmung entlastet und die Endonukleaseaktivität gefördert wird, was mit einer DNA-Fragmentierung einhergeht (Sakahira *et al.*, 1998). Des Weiteren spaltet sie  $\alpha$ -Fodrin, wodurch die strukturelle Umlagerung und die damit verbundene Bildung von Membranbläschen (Martin *et al.*, 1995) einhergeht.

Abb. 31 zeigt die Ergebnisse dieser Färbung im Kolongewebe von WT (A und B) und MGMT-defizienten (C und D) Mäusen nach 21 Tagen Fütterung. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen nach der *cleaved*-Caspase 3-Färbung und deren Vergrößerungen vom WT sind in Abb. 31 A und die von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren in Abb. 31 C dargestellt. *Cleaved* Caspase 3-positive Zellen wurden in den vergrößerten Bildausschnitten mit roten Pfeilen markiert. Vergleichbar zum TUNEL-Assay wurde auch hier das Fluoreszenzsignal verteilt über das gesamte Kolonepithel beobachtet.

Die statistische Evaluation ergab in beiden Genotypen (WT in Abb. 31 B, MGMT<sup>-/-</sup> in Abb. 31 D) eine deutliche Reduktion der *cleaved* Caspase 3-positiven Zellen. Nach Eisencitrat waren im wildtypischen Kolonepithel durchschnittlich 6,9 positive Zellen pro



Bildausschnitt quantifizierbar, während die Anzahl nach Häm-Eisen signifikant auf ca. 1,7 Zellen abnahm. Die Eisencitratdiät resultierte im Kolonepithel MGMT-defekter Mäuse in durchschnittlich 4,5 positiven Zellen, wohingegen diese nach Häm-Eisen signifikant auf einen Wert von 2,7 sank.



**Abbildung 31: IHC-Analyse der Spaltung von Caspase 3 im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Tieren.** Nach 21 Tagen Eisencitrat bzw. Häm-Eisen wurde das Kolongewebe fixiert und die Spaltung der Caspase 3 mittels *cleaved* (cl.) Caspase 3-IHC angefärbt. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von Kolonepithelschnitten von WT (A) und MGMT-defizienten (C) Mäusen. In Blau (TO-PRO3) sind Zellkerne und in Grün cl. Caspase 3-positive Zellen abgebildet. Weiße Quadrate stellen vergrößerte Ausschnitte dar. Rote Pfeile zeigen positive Zellen. Quantifizierung der positiven Zellen pro Ausschnitt (WT: B; MGMT<sup>-/-</sup>: D). Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM (n=5, je 6-10 Ausschnitte) dargestellt und mittels *Student's t-Test* statistisch ausgewertet. \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des TUNEL-Assays ergab hier ein Vergleich der Genotypen nach Eisencitrat eine erhöhte Anzahl *cleaved* Caspase 3-positiver Zellen im WT verglichen zu MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen, wohingegen nach Häm-Eisen im Kolonepithel MGMT-defizienter Mäuse mehr positive Zellen, ohne statistische Signifikanz, beobachtet wurden (Abb. 58 C siehe Anhang).

Zusammenfassend zeigten sowohl die Ergebnisse des TUNEL-Assays als auch die immunhistochemische Analyse der Spaltung der Caspase 3 eine signifikante Reduktion der Apoptose-Induktion nach einer Kurzzeitdiät mit Häm-Eisen im Vergleich zu Eisencitrat unabhängig vom MGMT-Status.

#### 4.8 Häm-Eisen-vermittelte intestinale Inflammation

Zur Untersuchung einer potenziellen Koloninflammation durch Häm-Eisen wurden WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse mit Eisencitrat oder Häm-Eisen bis zu 162 Tage gefüttert. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abschnitt 3.6.2 dargestellt. Die Beobachtung der Koloninflammation erfolgte während des kompletten Versuchsablaufs an ausgewählten Tagen (Tag 21, 56, 85, 112, 162) durch eine nicht-invasive Mini-Endoskopie (3.8). Der Grad der Darmentzündung wurde mittels MEICS (*murine endoscopic index of colitis severity*, 3.8.1) beurteilt. In Abb. 32 sind die Werte des MEICS von WT (A) und MGMT<sup>-/-</sup> (B) Tieren dargestellt.

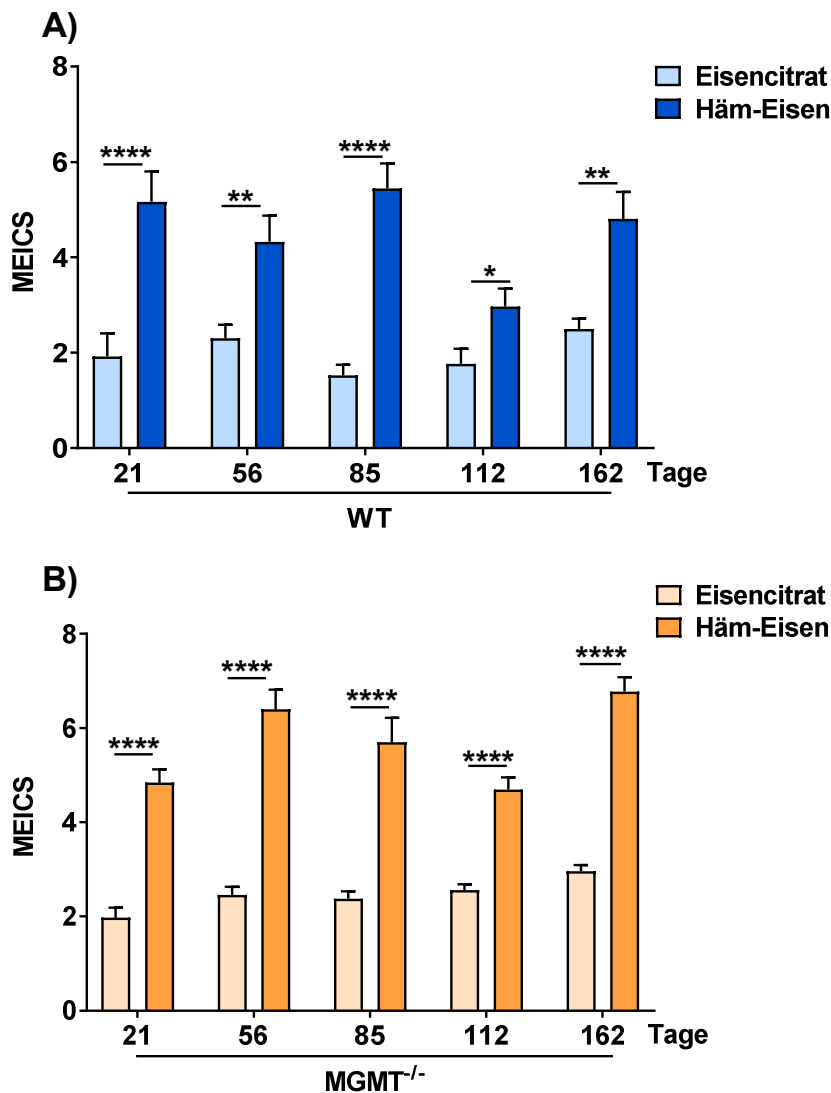
Häm-Eisen induzierte bereits nach 21 Tagen eine signifikant erhöhte Kolonentzündung in WT Mäusen, die chronisch bis zum Versuchsende bestehen blieb. Die Bestimmung der Koloninflammation mittels MEICS über 162 Tage ergab während des kompletten Versuchsablaufs ein Kontrollniveau von 2 bis 2,5 nach Eisencitrat, wohingegen nach Häm-Eisen signifikant erhöhte MEICS zwischen 3 und 5 beobachtet wurden (Abb. 32 A).

Vergleichbar zu den Ergebnissen der WT Mäuse zeigten auch die MGMT-reparaturdefekten Tiere signifikante Unterschiede in der Häm-Eisen-vermittelten Kolonentzündung. Die Fütterung mit der Eisencitratdiät ergab MEICS zwischen 2 und 3, während nach der Häm-Eisendiät signifikant die MEICS auf Werte zwischen 5 und 7 anstiegen und daraus ableitend Häm-Eisen zu einer verstärkten Kolonentzündung führte (Abb. 32 B).

Ein Vergleich der MEICS der WT Tiere mit denen der MGMT<sup>-/-</sup> Tiere jeweils nach der Häm-Eisendiät zeigte signifikant erhöhte MEICS der MGMT<sup>-/-</sup> an den Tagen 56, 112 und 162 im Vergleich zu den wildtypischen Tieren nach dieser Diät (Abb. 60 siehe Anhang).

Über die Dauer von 162 Tagen bewirkte die Häm-Eisen-angereicherte Diät im Vergleich zu der Eisencitratkontrolldiät eine chronische Darmentzündung in beiden Genotypen, die

bereits nach 21 Tagen signifikant messbar war. Die *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten teilweise eine erhöhte Koloninflammation nach der Häm-Eisendiät, verglichen mit den WT Tieren, was für eine erhöhte Anfälligkeit dieser Mäuse auf die Häm-induzierte Darmentzündung spricht.



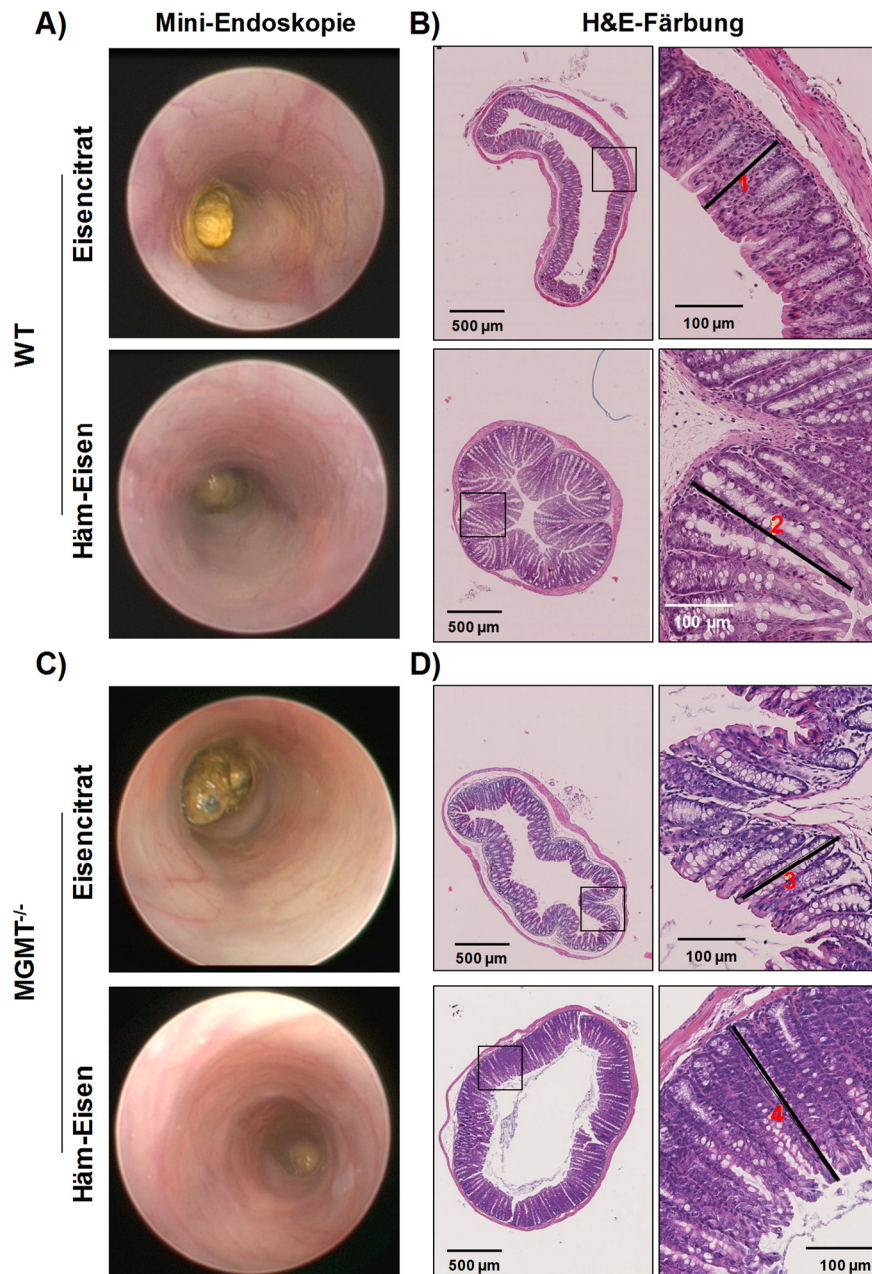
**Abbildung 32: Analyse der Kolitis (MEICS) nach Eisencitrat oder Häm-Eisen in WT und *MGMT*<sup>-/-</sup>.**

WT (A) und *MGMT*<sup>-/-</sup>(B) Mäuse wurden über 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die Kolonentzündung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Mini-Endoskopie an narkotisierten Mäusen untersucht. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n \geq 9$ ) dargestellt. Die statistische Auswertung der MEICS von WT und *MGMT*-defizienten Mäusen erfolgte mit *Student's t*-Test. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

In Abb. 33 A sind repräsentative Aufnahmen der Mini-Endoskopie an Tag 21 nach Fütterung mit Eisencitrat und Häm-Eisen in beiden Genotypen dargestellt. Die Eisencitratdiät bewirkte in beiden Genotypen keine Ausprägung von Entzündungsparametern, was mit einer hohen epithelialen Transparenz und einem normalen Blutgefäßmuster einherging. Die Häm-Eisenfütterung hingegen induzierte ein verdicktes Kolonepithel mit erhöhter Granularität und mehr Fibrin. Zudem waren nach der



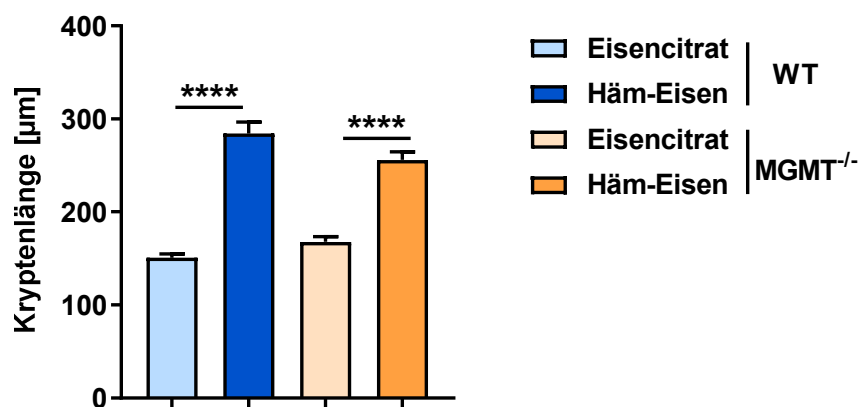
Häm-Eisendiät teilweise Veränderungen des Blutgefäßmusters und Dysplasien zu erkennen. Diese Häm-Eisen-spezifischen Veränderungen wurden sowohl in WT als auch in *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet.



**Abbildung 33: Repräsentative Aufnahmen der Koloskopie und H&E-Färbungen.**

WT und *MGMT*<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. A) Repräsentative Aufnahmen einer Mini-Endoskopie in WT Tieren. B) Exemplarischer Scan der H&E-Färbungen von Kolongewebe wildtypischer Mäuse dargestellt mit NDP.view2. Das Quadrat zeigt vergrößerte Ausschnitte der H&E-Färbung. Die schwarze Markierung ist ein Lineal zur Messung der Kryptenlänge (1: 146 µm; 2: 292 µm). Die mini-endoskopischen Aufnahmen der *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäuse sind in C) und deren Scans der H&E-Färbungen des Kolongewebes in D) dargestellt. Die Kryptenlängen sind als schwarzes Lineal in den vergrößerten Aufnahmen angegeben (3: 175 µm; 4: 277 µm).

Zur weiteren Analyse der Kolonentzündung wurden Nekropsien an Tag 21 durchgeführt und das Kolongewebe auf unterschiedliche Entzündungsmarker hin untersucht. Mithilfe einer H&E-Färbung (3.13) wurden histologische Veränderungen des Kolonepithels sichtbar gemacht und Entzündungsparameter bestimmt, die sich u.a. in der Verlängerung der Kolonkrypten andeuten. In Abb. 33 B sind exemplarische Scans der H&E-Färbungen der Kolongewebe beider Genotypen dargestellt. Repräsentative Ausschnitte sind neben dem jeweiligen Scan abgebildet. In diesen Vergrößerungsausschnitten wurden die Kryptenlängen mithilfe der NDP.view2-Software als schwarzes Lineal mit roten Zahlen dargestellt. In beiden Genotypen bewirkte die Häm-Eisendiät eine signifikante Verlängerung der Krypten. Abb. 34 stellt die quantitative Evaluation der Kryptenlängen beider Genotypen nach 21 Tagen Spezialdiät dar. Die durchschnittliche Kryptenlänge der wildtypischen Mäuse nach Eisencitrat betrug 151  $\mu\text{m}$  und stieg nach der Häm-Eisenfütterung auf ca. 284  $\mu\text{m}$ . Vergleichbare Kryptenlängen waren in *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen messbar. Nach Eisencitrat wiesen die Krypten hier eine durchschnittliche Länge von 167,9  $\mu\text{m}$  auf und nach Häm-Eisen ca. 256  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 34: Kryptenlängen nach Eisencitrat- und Häm-Eisendiät.**

WT und *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit Eisencitrat oder Häm-Eisen für 21 Tage gefüttert. Die Analyse der Kryptenlänge erfolgte anhand von H&E-Färbungen des Kolons mithilfe der Software NDP.view2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, je 6 Ausschnitte) und die statistische Auswertung erfolgte mit *Student's t-Test*. \*\*\*\*p<0,0001.

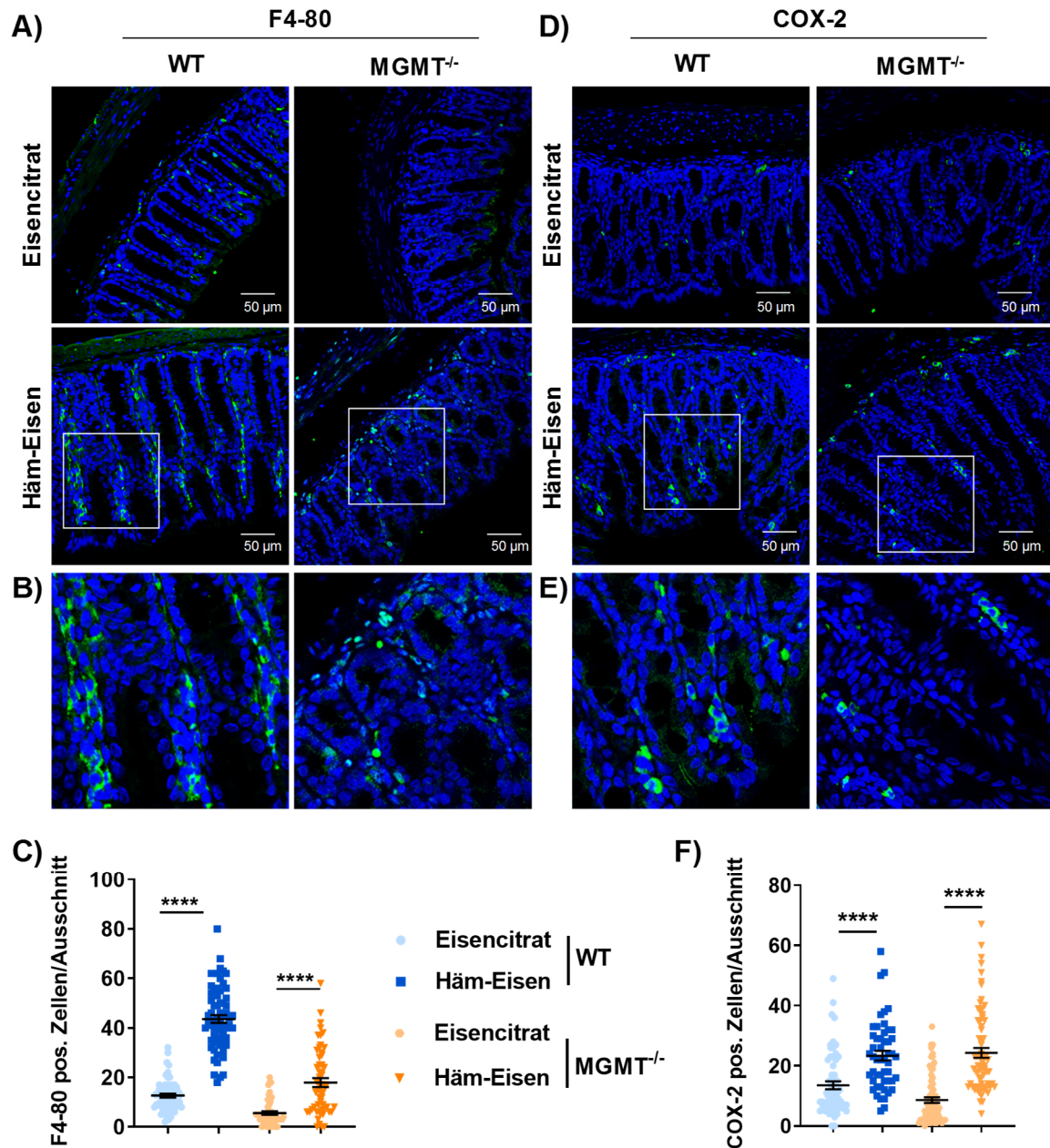
Weiterhin wiesen histopathologische Untersuchungen des Kolonepithels, die von [REDACTED] durchgeführt wurden, auf ein diskretes Entzündungsmuster hin (Abb. 53 B siehe Anhang). Die Häm-vermittelte Koloninflammation nach 21 Tagen Fütterung wurde zusätzlich mit molekularen Markern immunhistologisch verifiziert. Das in Paraffin eingebettete Kolongewebe wurde, wie in Abschnitt 3.12 beschrieben, vorbehandelt und anschließend mit den entsprechenden

Antikörpern gefärbt. Um vorwiegend Makrophagen anzufärben, wurden die Gewebeschnitte mit einem mausspezifischen F4-80-Antikörper inkubiert. Abb. 35 A zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Färbung in beiden Genotypen, deren statistische Auswertung als F4-80-positive Zellen pro Bildausschnitt Abb. 35 C visualisiert. Im Kolon der WT Mäuse wurden nach Eisencitratdiät im Durchschnitt 12,6 positive Zellen pro Ausschnitt dokumentiert, die nach Häm-Eisen signifikant auf eine durchschnittliche Anzahl von 43,6 anstieg. Im Kolonepithel MGMT-defekter Mäuse waren nach der Fütterung mit Eisencitrat ca. 5,6 positive Zellen erkennbar, die nach der Häm-Eisendiät signifikant auf einen mittleren Wert von 17,9 anstiegen. Vergrößerungsausschnitte der Kolonepithelien nach Häm-Eisen sind in Abb. 35 B dargestellt.

Vergleicht man die Werte der F4-80-Färbungen zwischen den Genotypen, so wurden signifikant weniger positive Zellen im Kolonepithel MGMT-defizienter Mäuse sowohl nach Eisencitrat als auch nach Häm-Eisen beobachtet (Abb. 61 A siehe Anhang). Der Häm-Eisen-vermittelte Anstieg der F4-80-positiven Makrophagen deutet auf eine Infiltrierung von Monozyten in das entzündete Gewebe hin, die sich dort zu Makrophagen differenzieren. Des Weiteren wurden auch gewebständige Makrophagen mit diesem Antikörper angefärbt. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Häm-Eisen-vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems hin.

Ein weiterer Entzündungsmarker ist COX-2. Er wird bei Entzündungen induziert, wohingegen die COX-1 Variante konstitutiv exprimiert wird. Beide sind u.a. für die Synthese von Prostaglandinen verantwortlich (DuBois *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1993). In Abb. 35 D sind exemplarische Aufnahmen und in 35 E Vergrößerungen der COX-2-Färbung nach beiden Diäten in WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen abgebildet. Die quantitative Evaluation der immunhistologischen COX-2-Färbung der Kolongewebe nach 21 Tagen Fütterung ist in Abb. 35 F dargestellt. Das Kolonepithel der WT Mäuse zeigte nach Eisencitrat eine durchschnittliche Anzahl von 13,5 positiven Zellen pro Ausschnitt, während die Häm-Eisen-angereicherte Diät einen signifikanten Anstieg der COX-2-positiven Zellen auf ca. 23,4 Zellen bewirkte. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den MGMT-defekten Mäusen beobachtet. Hier resultierte die Eisencitratdiät in einer mittleren Anzahl von 8,6 positiven Zellen, während Häm-Eisen diese Anzahl signifikant auf ca. 24,3 erhöhte.

Der statistische Vergleich ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 61 B siehe Anhang).



**Abbildung 35: IHC-Analyse von Makrophagen und COX-2-postiven Zellen.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten für 21 Tage eine Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät. (A+D) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen mit einer 40x Vergrößerung und einem digitalen Zoom von 0,6. Die Zellkerne sind blau (TO-PRO3) dargestellt und das grüne Signal zeigt F4-80- (A) oder COX-2-positive (pos.) Signale (D). Vergrößerungen der F4-80-Färbungen sind in (B), die der COX-2-Färbungen in (E) dargestellt. Statistische Evaluation der F4-80-(C) und COX-2 (F)-positiven Zellen in murinem Kolongewebe. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ , je 6-10 Ausschnitte pro Tier) dargestellt und die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

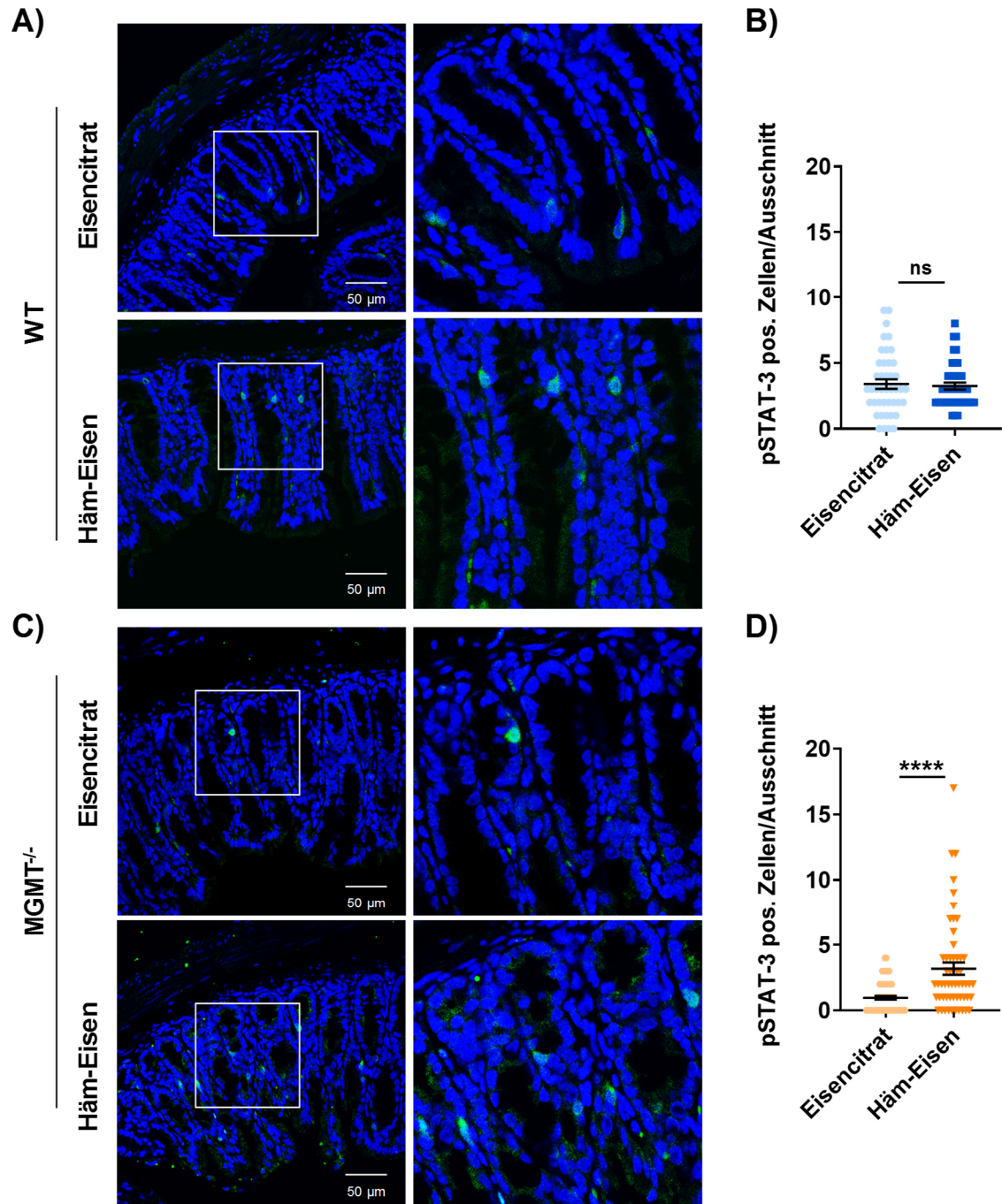
Zudem wurde die Phosphorylierung von STAT-3 immunhistologisch im Kolongewebe nach den Spezialdiäten bestimmt (Abb. 36). STAT-3 wird als Antwort auf Zytokine, wie z.B. das proinflammatorische IL 6, phosphoryliert und ist in der Regulierung inflammatorischer Prozesse beteiligt (Sansone *et al.*, 2012). In Abb. 36 A sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen und Vergrößerungen der pSTAT-3-Färbungen des Kolonepithels nach beiden Diäten in WT Mäusen dargestellt. Die Anzahl pSTAT-3-positiver Zellen wurde in Abb. 36 B quantifiziert. Im Kolonepithel von WT Mäusen wurden nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede der Phosphorylierung von pSTAT-3 zwischen den verschiedenen Diäten beobachtet. Abb. 36 C repräsentiert konfokalmikroskopische Aufnahmen des Kolonepithels und deren Vergrößerungen von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach den Spezialdiäten. Deren Quantifizierung ist in Abb. 36 D dargestellt. Im Gegensatz zum WT zeigte die Häm-Eisendiät im Kolon der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse einen signifikanten Anstieg pSTAT-3-positiver Zellen von ca. 0,7 (Eisencitrat) auf ca. 3,8.

Interessanterweise wiesen die MGMT<sup>-/-</sup> nach Eisencitrat ein signifikant geringeres basales Level an pSTAT-3-positiven Zellen auf, verglichen mit dem wildtypischen Kolonepithel nach Eisencitratdiät. Der Vergleich der Häm-Eisendiäten zwischen den Genotypen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 61 C siehe Anhang).

Zur weiteren Untersuchung der Beeinflussung von Häm-Eisen auf das Immunsystem, wurden T-Zellen im Kolonepithel mit einem spezifischen CD3-Antikörper immunhistochemisch gefärbt (Abb. 37). Teilabbildung 37 A zeigt repräsentative Aufnahmen des Kolonepithels von WT Mäusen und deren Vergrößerung. Die Quantifizierung der CD3-positiven Zellen ist in Abb. 37 B dargestellt. Die 21-tägige Häm-Eisendiät bewirkte im Kolon der wildtypischen Tiere einen signifikanten Anstieg CD3-positiver Zellen auf ca. 5,1, verglichen mit der mittleren Anzahl der positiven Zellen nach Eisencitrat, die bei ca. 4,0 lag. Exemplarische mikroskopische Aufnahmen der CD3-Färbung des Kolonepithels MGMT-defizienter Mäuse und deren Vergrößerung ist in Abb. 37 C visualisiert und in 37 D quantifiziert. Hier wurde ein nicht-signifikanter Anstieg zwischen der Anzahl CD3-positiver Zellen nach Eisencitrat (ca. 5,1) und Häm-Eisen (ca. 6,7) beobachtet. Es wurden hier keine Unterschiede zwischen den Genotypen dokumentiert (Abb. 61 D siehe Anhang).

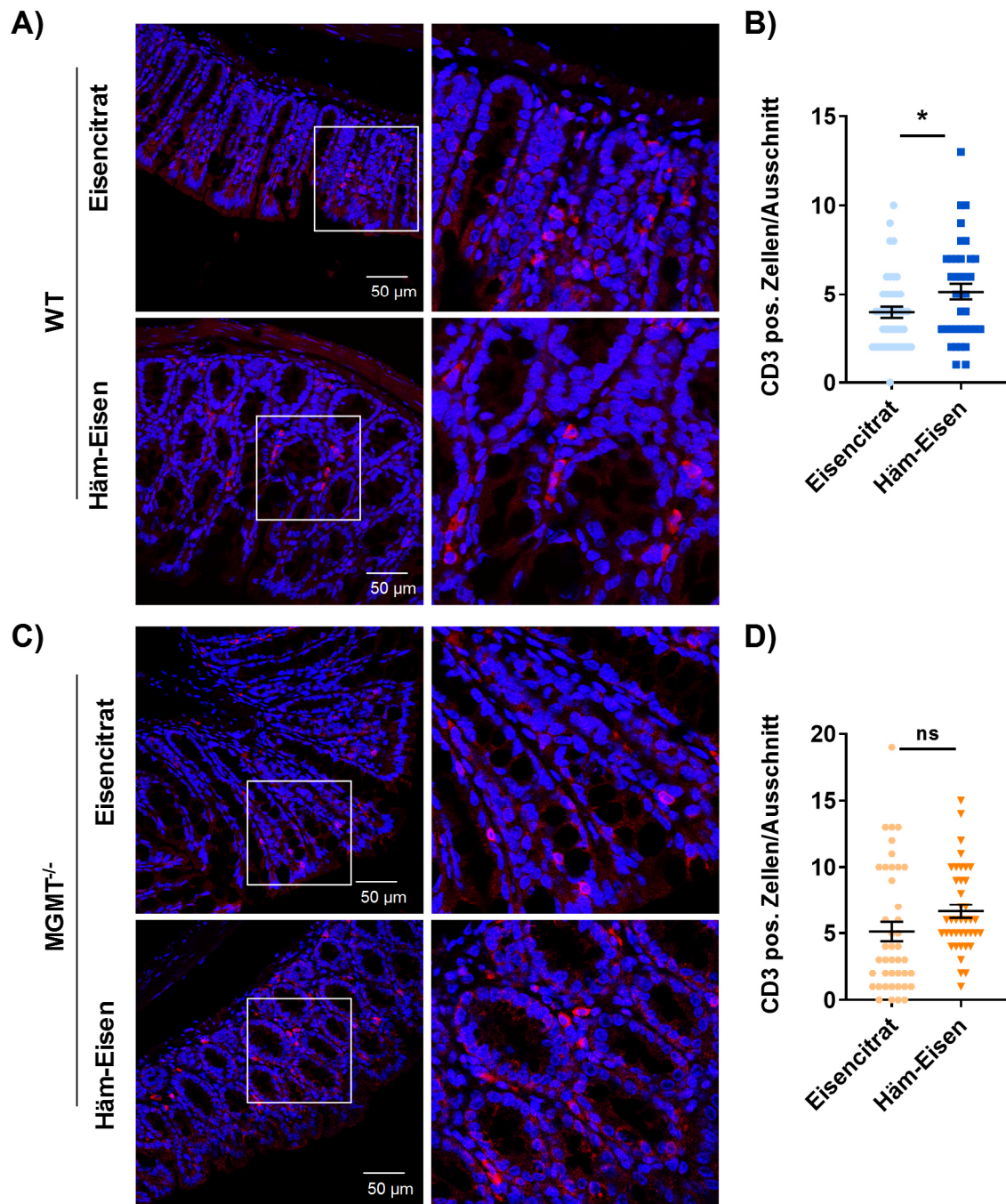
Zusammen mit den Ergebnissen der Mini-Endoskopie und den histopathologischen Untersuchungen der H&E-Färbung liefern diese immunhistochemischen Analysen deutliche Hinweise einer Häm-Eisen-vermittelten Kolitis. Diese Beobachtungen werden im folgenden Abschnitt mit Fokus auf die Beteiligung des intestinalen Immunsystems genauer charakterisiert.





**Abbildung 36: IHC-Analyse des Kolonepithels von pSTAT-3.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen und Vergrößerungsaufnahmen des Kolongewebes von WT (A) und MGMT<sup>-/-</sup> (C) Mäusen. Aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung und 0,6-fachem digitalem Zoom. In Blau (TO-PRO3) sind die Zellkerne dargestellt und in Grün pSTAT-3. Quantitative Auswertung der Färbung als pSTAT-3 positive Zellen von WT (B) und MGMT<sup>-/-</sup> (D) Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ , je 6-10 Ausschnitte) und die statistische Analyse erfolgte mit *Student's* t-Test. ns=nicht signifikant; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Abbildung 37: Nachweis von CD3-positiven Zellen im Kolon von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen und Vergrößerungsaufnahmen des Kolongewebes von WT (A) und MGMT<sup>-/-</sup> (C). Aufgenommen mit einer 40x Vergrößerung und 0,6-fachem digitalem Zoom. In Blau (TO-PRO3) sind die Zellkerne dargestellt und in Rot CD3. Quantitative Auswertung der Färbung als CD3-positive (pos.) Zellen von WT (B) und MGMT<sup>-/-</sup> (D) Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ , je 6-10 Ausschnitte), die mittels Student's t-Test statistisch ausgewertet wurden. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ .

#### 4.8.1 Häm-Eisen-bedingte Veränderung der intestinalen Immunzellen

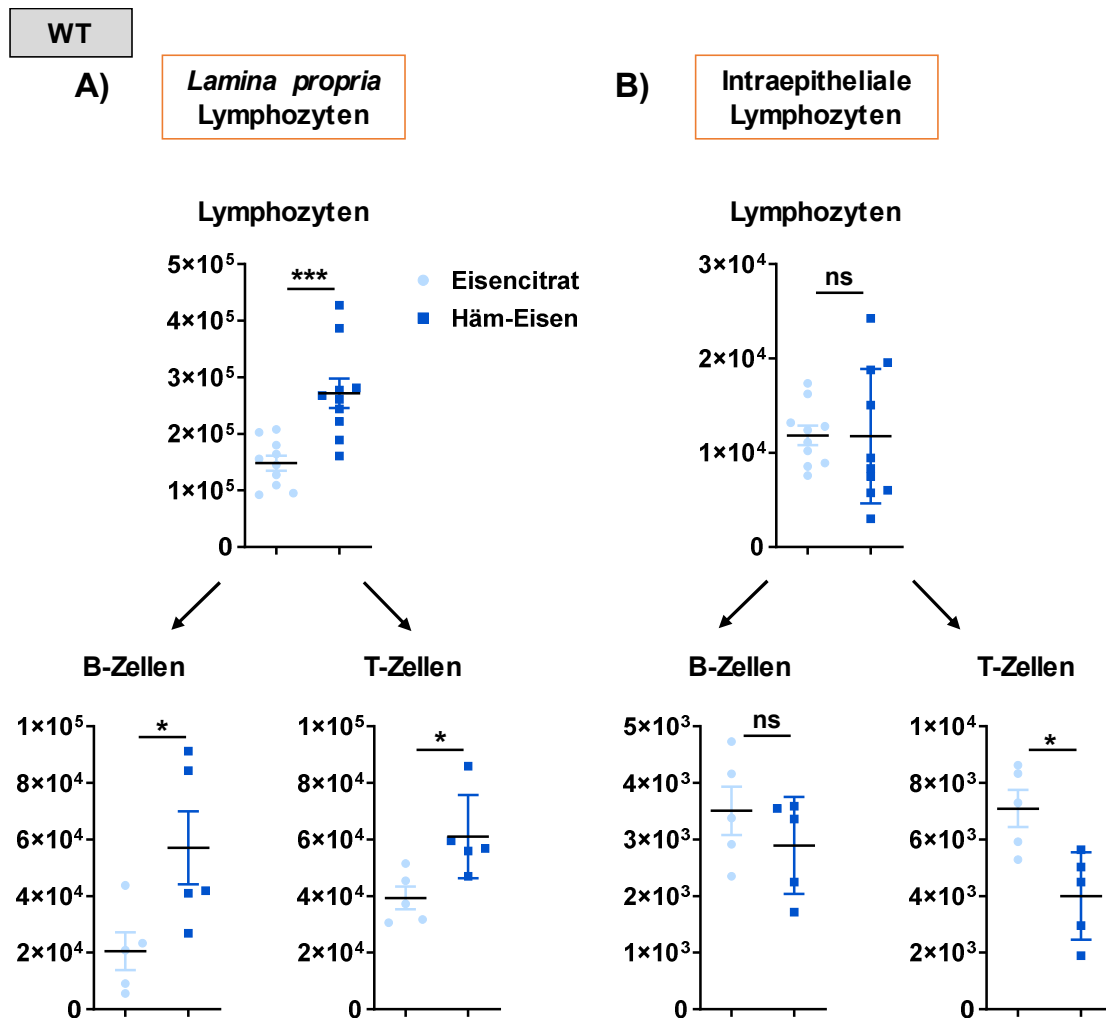
Zur detaillierten Beurteilung der lymphoiden und myeloiden Immunzellpopulationen nach 21 Tagen Spezialdiät wurden *Lamina propria* Lymphozyten (LPL) und intraepithelialen Lymphozyten (IEL), wie in 3.11 beschrieben, untersucht. Die Gewebeproben wurden hierzu der AG von [REDACTED] zur Verfügung gestellt und von [REDACTED] weiter aufgearbeitet sowie analysiert. Die dazugehörigen repräsentativen *Dot Plots* und *Gatings* der FACS-Analysen sind im Anhang in den Abb. 66-84 zu finden. Zunächst wurden die lebenden Gesamtleukozyten mit den Antikörpern CD45-V510 und Viab-APC/Cy7 per *Gating* vorselektioniert und anschließend die entsprechenden Lymphozytenpopulationen mit Antikörpern aus Tabelle 9 gefärbt. Aus diesen wurden CD45R/B220-PerCP<sup>+</sup> B-Zellpopulationen identifiziert, die wiederum in CD11b<sup>+</sup> Immunzellen und schließlich in Monozyten, Makrophagen und Granulozyten unterteilt wurden. In weiteren Ansätzen wurden aus der Gesamtanzahl lebender Lymphozyten einerseits die TCR β<sup>+</sup> Zellen, wie die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, und zusätzlich die Zahl der TCR γδ<sup>+</sup> Zellen ermittelt.

Abb. 38 A zeigt die Anzahl der LPL von WT Mäusen nach 21 Tagen Diät. Die Gesamtanzahl der LPL der WT Mäuse stieg nach Häm-Eisenfütterung signifikant auf das rund 1,8-fache der Eisencitratkontrolle an. Diese Populationen wurden anschließend weiter in B- und T-Zellen mithilfe entsprechender Oberflächenmarker unterteilt. Häm-Eisen erhöhte die Anzahl der B-Zellen signifikant auf durchschnittlich das 2,8-fache und die T-Zellpopulation signifikant auf das 1,5-fache der Anzahl nach Eisencitrat.

Im intraepithelialen Kompartiment wurden keine signifikanten Unterschiede der Gesamtlymphozytenzahl zwischen Eisencitrat- und Häm-Eisen-gefütterten Tieren beobachtet (Abb. 38 B). Die genauere Analyse der Gesamt-IEL zeigt, dass die B-Zellpopulation nach Häm-Eisen eine tendenziell geringere Zellzahl im Vergleich zu Eisencitrat aufweist, während sich die Anzahl der T-Zellen signifikant um ca. 56 % nach Häm-Eisen reduziert.

Zusammengenommen lässt sich festhalten, dass die Anzahl der T- und B-Zellen innerhalb der LP nach Häm-Eisen zunimmt und diese sich im intraepithelialen Kompartiment tendenziell reduziert.

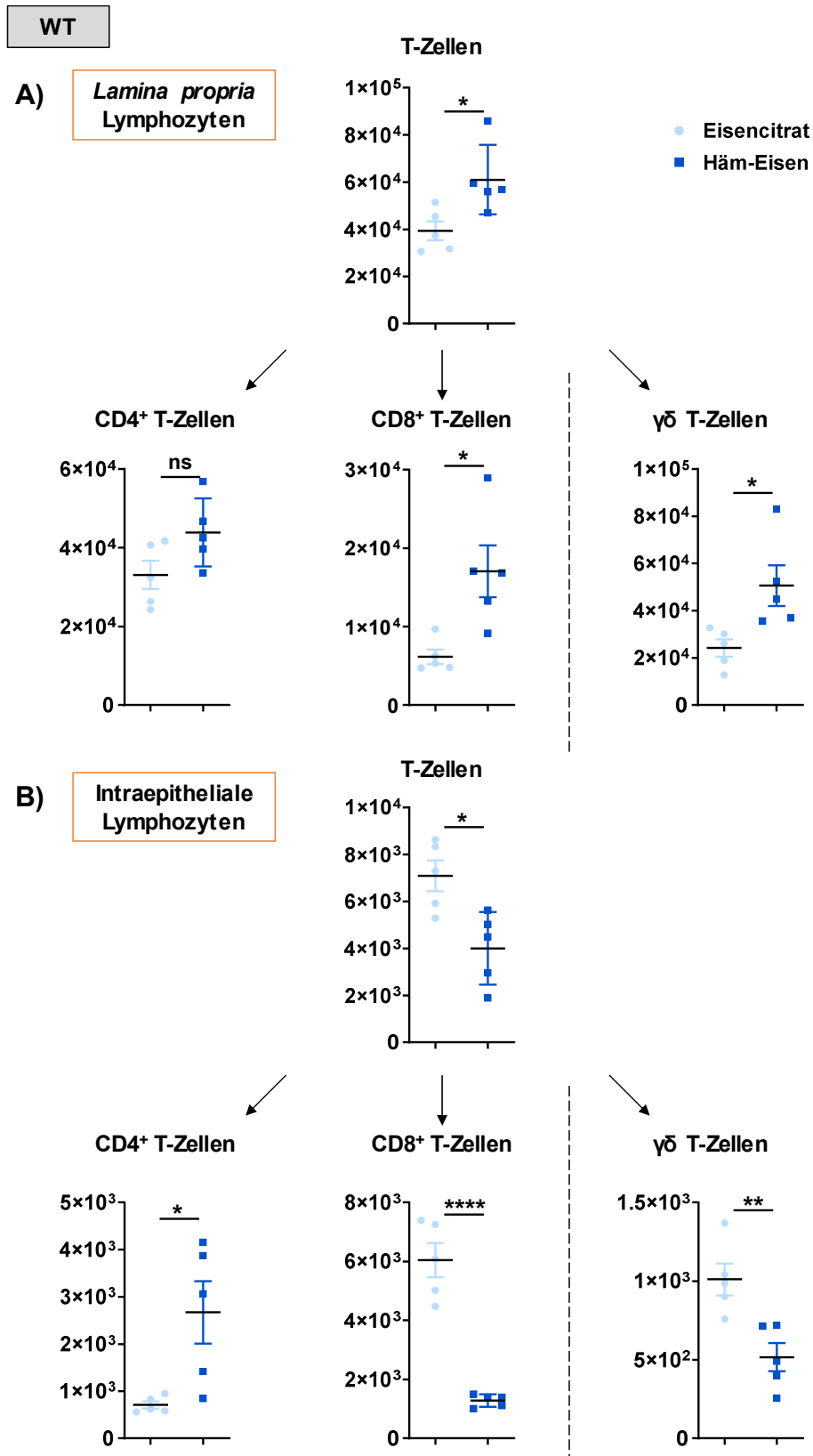




**Abbildung 38: Einfluss von Häm-Eisen auf die IEL und LPL im Kolon von WT Mäusen.**

Die Mäuse wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und die LPL bzw. IEL isoliert. Gesamtzahl der LPL (A) und IEL (B) ist aufgeteilt in B- und T-Zellen. Dargestellt sind *Scatter-Blots* mit Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Die detaillierte Aufschlüsselung der bereits in Abb. 38 gezeigten T-Zellen wildtypischer Mäuse in die einzelnen T-Zellsubpopulationen innerhalb der LPL und IEL ist in Abb. 39 dargestellt. Teilabbildung 39 A verdeutlicht einen tendenziellen Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der LP von ca.  $3,3 \times 10^4$  nach Eisencitrat auf eine durchschnittliche Anzahl von  $4,4 \times 10^4$  nach Häm-Eisen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen stiegen nach Häm-Eisen signifikant auf ca. das 2,8-fache der Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Eisencitrat an. Zudem bewirkte die Fütterung mit Häm-Eisen eine signifikant höhere Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen (2,1-fache der Eisencitratkontrolle).



**Abbildung 39: Einfluss von Häm-Eisen auf verschiedene intestinale T-Zellpopulationen in WT Mäusen.**

Die Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Analyse von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und γδ T-Zellen innerhalb der LPL (A) und den IEL (B). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=5), statistisch ausgewertet mit Student's t-Test. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

Die T-Zellpopulationen der IEL sind in Abb. 39 B dargestellt. Hier führte die Häm-Eisendiät zu einem signifikanten Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf das ca. 3,8-fache der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Eisencitrat, trotz der generellen Abnahme der Gesamtlymphozytenzahl. Im Gegensatz dazu resultierte Häm-Eisen in einer signifikanten Reduktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf ca. 21 % von Eisencitrat. Auch hinsichtlich der  $\gamma\delta$  T-Zellpopulation bedingte Häm-Eisen eine signifikante Reduktion um ca. 50 %.

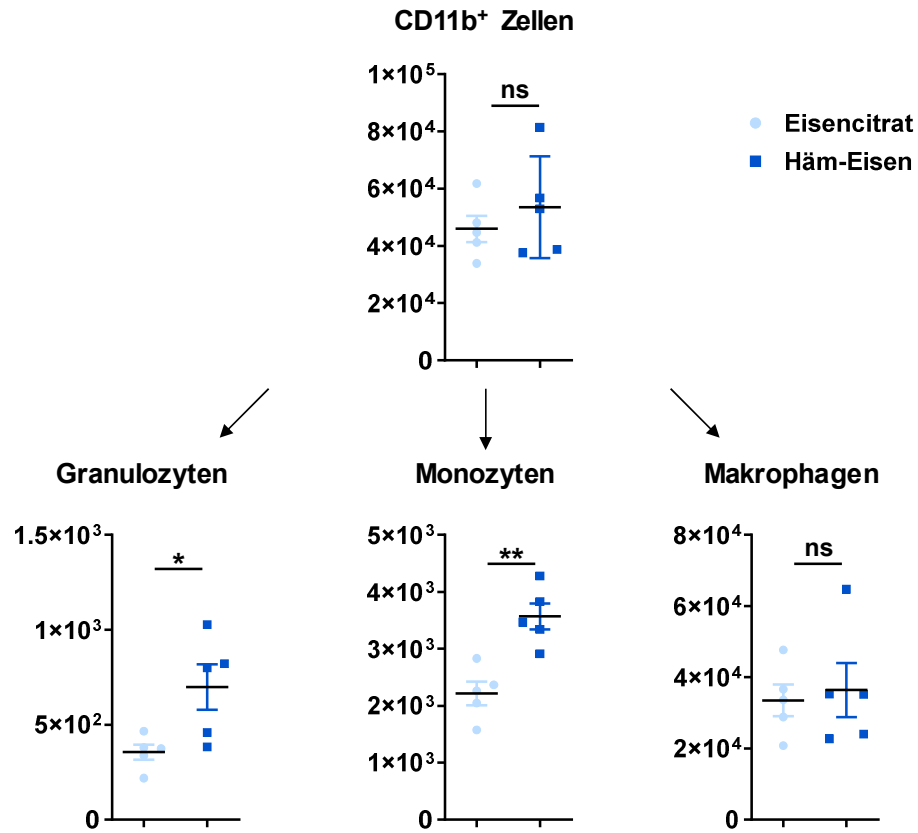
Die 21-tägige Häm-Eisendiät bewirkte eine Verschiebung der T-Zellpopulationen. Während in der LP nach Häm-Eisen die Anzahl der T-Zellen signifikant stieg, wurde intraepithelial eine Häm-Eisen-bedingte Abnahme der Gesamtanzahl der T-Zellen beobachtet. Hier wurde lediglich ein Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dokumentiert.

In Abb. 40 sind die Einflüsse von diätischem Häm-Eisen auf die myeloiden intestinalen Immunzellen dargestellt. Hier wurden zunächst CD11b<sup>+</sup> Zellen mittels Antikörperfärbung phänotypisiert und anschließend mit den entsprechenden Markern für Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gefärbt (Tabelle 9). Teilabbildung 40 A repräsentiert die Ergebnisse dieser Färbungen innerhalb der LP-ständigen Immunzellen. Nach den Spezialdiäten wurde keine signifikante Zellzahländerung der CD11b<sup>+</sup> Zellen gemessen, wobei nach Häm-Eisen jedoch tendenziell mehr CD11b<sup>+</sup> Zellen beobachtet wurden (ca.  $4,6 \times 10^4$  nach Eisencitrat und ca.  $5,3 \times 10^4$  nach Häm-Eisen). Die Anzahl der Granulozyten verdoppelte sich nach diätischem Häm-Eisen und die Monozytenpopulation stieg hier auf das 1,6-fache im Vergleich zur Eisencitratkontrolle an. Häm-Eisen bewirkte zudem in der LP eine tendenzielle, aber nicht signifikante Einwanderung von Makrophagen, ähnlich den Ergebnissen der F4-80-IHC-Färbung (Abb. 35 A, B, C). Der verwendete Monozytenmarker färbt sowohl Monozyten als auch Makrophagen. Aus dieser Population wurden die Makrophagen selektiv als Subpopulation (Anti-CD206-FITC) angefärbt und deren Anzahl bestimmt.

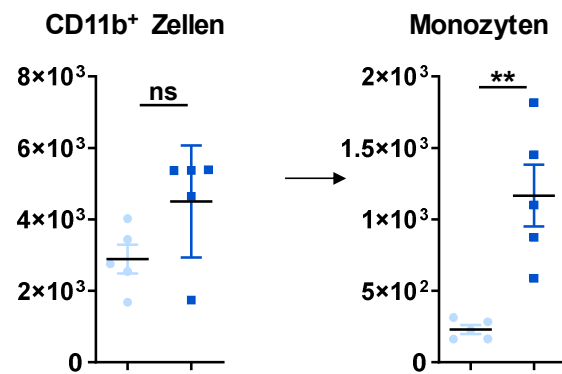
Vergleichbar mit den Analysen der LP wurden auch intraepithelial tendenziell mehr CD11b<sup>+</sup> Zellen dokumentiert (Abb. 40 B). Hier resultierte die Eisencitratdiät in einer durchschnittlichen Anzahl von  $2,9 \times 10^3$  Zellen, die nach Häm-Eisen auf einen mittleren Wert von  $4,5 \times 10^3$  Zellen anstieg. Die Monozytenpopulation zeigte nach Häm-Eisen eine signifikante Zunahme von ca. 230 auf ca. 1170, was auf eine vermehrte Infiltration von Monozyten in das entzündete Gewebe hindeutet. Aufgrund einer zu geringen Ausbeute konnte bei dieser Analyse nicht weiter in die Subpopulationen (v.a. Makrophagen) unterteilt werden. In der Monozytenpopulation sind die Makrophagen mit inbegriffen.

WT

A) *Lamina propria*



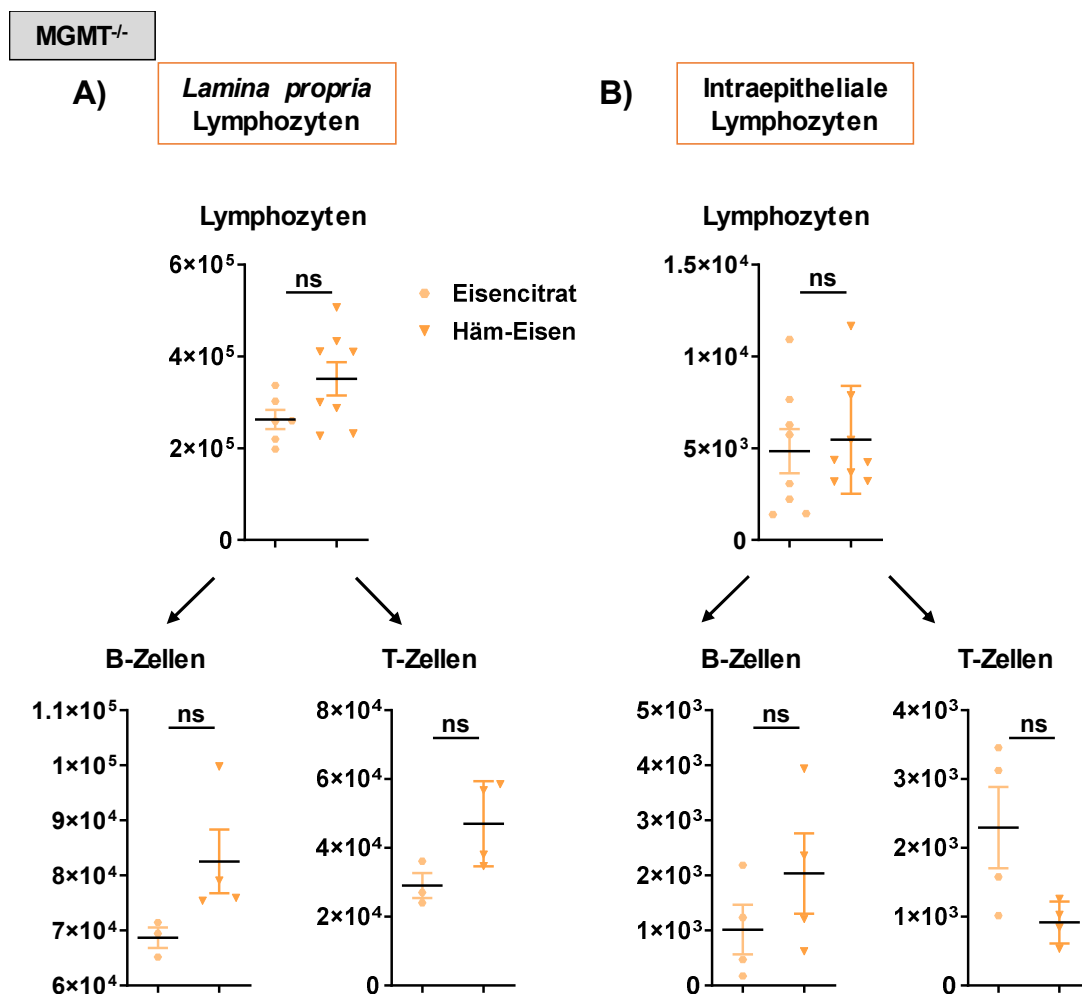
B) *Intraepitheliales Kompartiment*



**Abbildung 40: Analyse der myeloiden Immunzellen innerhalb der LP und im IE.**

WT Mäuse erhielten 21 Tage eine Diät mit Eisencitrat oder Häm-Eisen. Analyse von myeloiden Immunzellen innerhalb der LP (A) bzw. des IE (B). Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Die Statistik erfolgte mit Student's t-Test. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

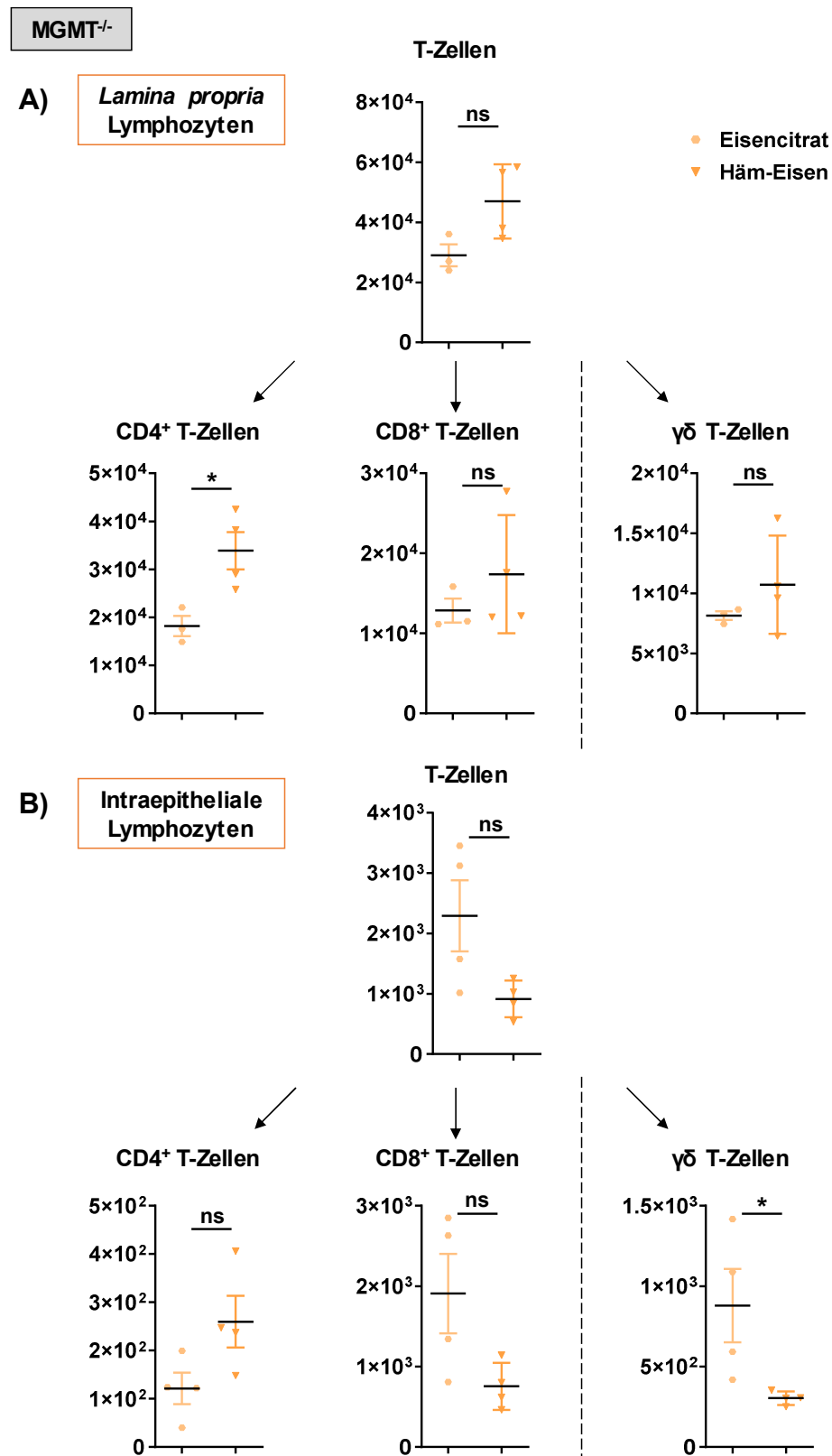
In Abb. 41 ist die Analyse der Lymphozyten von  $MGMT^{-/-}$  Mäusen nach 21 Tagen Eisencitrat oder Häm-Eisen dargestellt. In der LP bewirkte Häm-Eisen einen nicht signifikanten Anstieg der Lymphozytenzahl von ca.  $2,6 \times 10^5$  nach Eisencitrat auf ca.  $3,5 \times 10^5$  (Abb. 41 A). Auch die B- und T-Zellpopulationen stiegen nach Häm-Eisen tendenziell um 20 % (B-Zellen) bzw. 30 % (T-Zellen) an (Abb. 41 A). In Teilabbildung 41 B ist die Verteilung der IEL dargestellt. Häm-Eisen erhöhte hier die Gesamtlmphozytenzahl geringfügig von ca.  $4,8 \times 10^5$  auf ca.  $5,6 \times 10^5$ . Diätisches Häm-Eisen bedingte eine Verdopplung der B-Zellpopulationen, die aufgrund der großen Abweichungen der Einzelwerte nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der T-Zellen nach Häm-Eisen eine nicht signifikante Reduktion von ca. 2300 auf ca. 920 Zellen.



**Abbildung 41: Einfluss von Häm-Eisen auf die Lymphozytenzahl der LPL und IEL von  $MGMT^{-/-}$  Mäusen.** Die Mäuse wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und die LPL bzw. IEL isoliert. Die Gesamtanzahl der LPL (A) und IEL (B) wurden nach B- und T-Zellen phänotypisiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). Statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student's t-Test. ns=nicht signifikant.

Die detaillierte Aufteilung der T-Zellsubpopulationen im Kolon der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse ist in Abb. 42 dargestellt. Bei der hier dargestellten Gesamtanzahl der T-Zellen handelt es sich um die bereits in Abb. 41 gezeigten T-Zellen, die in Abb. 42 in die T-Zellsubpopulationen unterteilt wurden. Die T-Zellen der LP wurden nach CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen phänotypisiert. Häm-Eisen bewirkte in allen drei Subpopulationen einen leichten Anstieg der Zellzahl, der insbesondere für CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant war (Anstieg auf das ca. 1,4-fache). Die Analysen des IE sind in Abb. 42 B dargestellt. Während die Anzahl der intraepithelialen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht signifikant nach Häm-Eisen anstieg, reduzierte sich Zahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Aufgrund der hohen Abweichungen wurden hier keine statistischen Signifikanzen dokumentiert. Häm-Eisen bewirkte eine signifikante Abnahme der  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen auf ungefähr ein Drittel des Kontrollwertes nach Eisencitrat.

Der Einfluss von Häm-Eisen auf intestinale myeloide Blutzelllinien der MGMT-defekten Mäuse ist in Abb. 43 dargestellt. In der LP wiesen die CD11b<sup>+</sup> Zellen einen nicht signifikanten Anstieg nach Häm-Eisen von ca.  $4,2 \times 10^4$  auf ca.  $7,3 \times 10^4$  positive Zellen auf. Innerhalb dieser CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation wird die Anzahl der Monozyten und Granulozyten mithilfe bestimmter Marker (Tabelle 9) phänotypisiert. Beide Zellpopulationen zeigten nach Häm-Eisen einen Anstieg in ihrer Zellzahl, während die Monozyten signifikant auf ca. das Doppelte anstiegen. Die Anzahl der Makrophagenzahl stieg in der LP auf das ca. 1,7-fache an (Abb. 43 A). In Teilabbildung 43 B sind die Ergebnisse der myeloiden Zellen innerhalb des intraepithelialen Kompartiments MGMT-defekter Mäuse dargestellt. Hier bewirkte die Häm-Eisendiät einen signifikanten Anstieg der CD11b<sup>+</sup> Zellen von ca. 70 nach Eisencitrat auf durchschnittlich 410 Zellen. Hier konnte keine klare Differenzierung in Monozyten und Makrophagen durchgeführt werden. Die Gesamtanzahl der Monozyten/Makrophagen erhöhte sich signifikant von ca. 50 nach Eisencitrat auf ca. 300 Zellen nach Häm-Eisen.



**Abbildung 42: Einfluss von Häm-Eisen auf intestinale T-Zellpopulationen von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

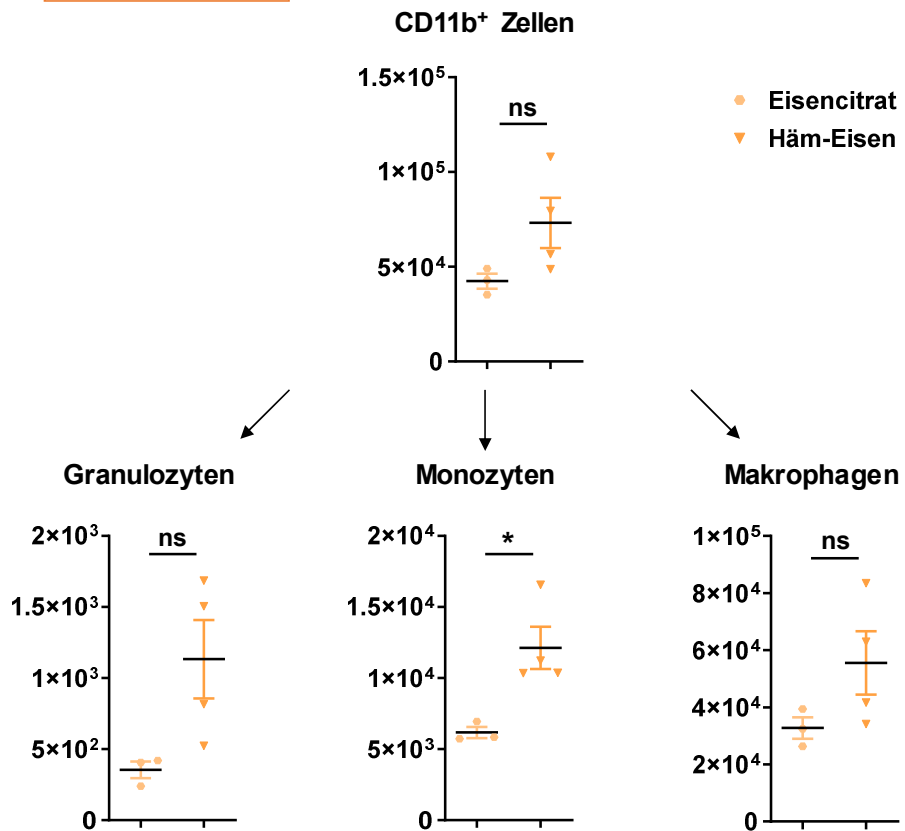
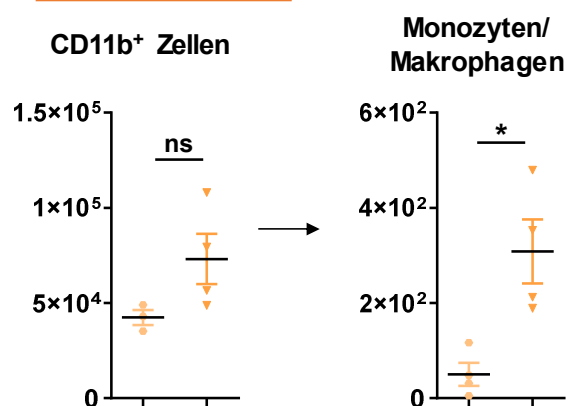
Die Tiere wurden 21 Tagen mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Analyse der verschiedenen T-Zellpopulationen innerhalb der LPL (A) und IEL (B). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ), statistisch ausgewertet mittels Student's t-Test. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



Zusammenfassend ist festzustellen, dass ähnliche Tendenzen unabhängig vom MGMT-Status nach diätischem Häm-Eisen in den intestinalen Immunzellen beobachtet werden können. In der LP bewirke eine 21-tägige Häm-Eisendiät einen Anstieg der Gesamtlymphozytenzahl. Eine genauere Phänotypisierung dieser Lymphozyten ergab einen Anstieg in allen analysierten lymphatischen Immunzellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Auch im Hinblick auf die myeloide Immunzellpopulationen bewirkte die Fütterung mit Häm-Eisen einen Anstieg der Gesamtzahl der CD11b<sup>+</sup> Zellen und weiter differenziert der Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, unabhängig von MGMT.

Im intraepithelialen Kompartiment wurden geringfügige Abweichungen beobachtet. Während in den WT Mäusen die Gesamtlymphozyten beinahe unbeeinträchtigt durch Häm-Eisen blieb, zeigten die IEL der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse einen nicht signifikanten Anstieg der Lymphozytenzahl. Diese Diskrepanzen spiegelten sich auch in der genaueren Betrachtung der B-Zellpopulationen wider. In den wildtypischen Tieren bewirkte Häm-Eisen eine nicht signifikante Reduktion der B-Zellpopulation, die sich in den MGMT-defekten Mäusen als nicht signifikanter Anstieg äußerte. Vergleichbare Auswirkungen hatte Häm-Eisen auf die T-Zellpopulationen; hier sank die Gesamtanzahl der T-Zellen, unabhängig vom MGMT-Status. Eine detaillierte Aufschlüsselung der T-Zellpopulationen nach Häm-Eisen ergab einen Anstieg der Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, während die CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ -T-Zellen in beiden Genotypen abnahmen. Die Anzahl der myeloiden Immunzellen (CD11b<sup>+</sup>, Monozyten/Makrophagen) stieg nach Häm-Eisen, unabhängig vom MGMT-Status.

Ein genauerer Vergleich der Genotypen untereinander ergab eine signifikant höhere Anzahl der Gesamtlymphozyten v.a. der B-Zellzahl in der LP der MGMT-defekten Mäuse (Abb. 62 siehe Anhang). Im Gegensatz dazu wurde im IE der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl nach Eisencitrat als auch nach Häm-Eisen eine signifikant geringe Lymphozyten-, B- und T-Zellzahl dokumentiert. Interessanterweise zeigten die CD11b<sup>+</sup> Zellen des IE der MGMT-reparaturdefizienten Mäusen nach beiden Diäten signifikant mehr Zellen, verglichen mit dem WT (Abb. 63 siehe Anhang).

MGMT<sup>-/-</sup>A) *Lamina propria*B) *Intraepitheliales Kompartiment*

**Abbildung 43: Analyse der myeloiden Immunzellen innerhalb der LP und des IE im Kolon von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Tiere erhielten 21 Tage eine Diät mit Eisencitrat oder Häm-Eisen. Myeloide Immunzellen innerhalb der LP werden in (A), die im intraepithelialen Kompartiment in (B) dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ), statistisch ausgewertet mittels *Student's t-Test*. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ .

#### 4.9 Einfluss von diätischem Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom

Zur Untersuchung des intestinalen Mikrobioms nach einer Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät wurden ausschließlich weibliche WT Mäuse, wie in Kapitel 3.16 beschrieben, behandelt und frische Stuhlproben an Tag -3, 21, 85 und 162 gesammelt. Die bakterielle DNA wurde, wie in 3.16.1 beschrieben, isoliert und der AG von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Dort erfolgten die 16S rRNA-Mikrobiomanalysen und deren Auswertung (3.16.2). Aus den Rohdaten wurden anschließend die Abbildungen erstellt, die im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

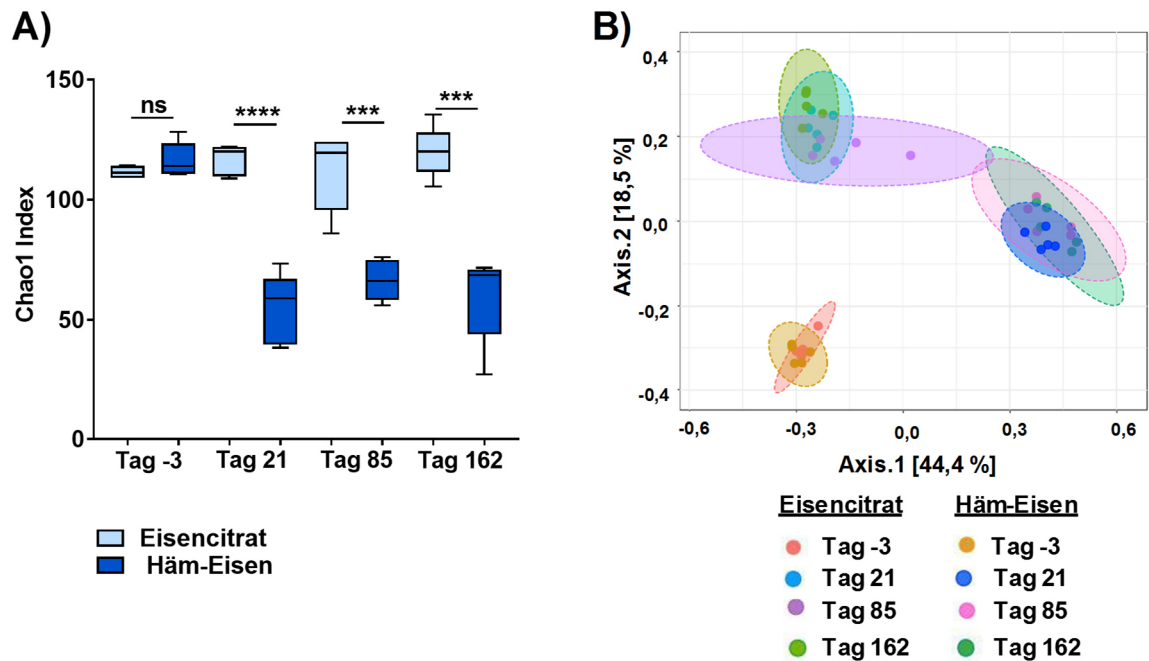
Zunächst wurde die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität nach den angegebenen Zeitpunkten und Diäten bestimmt. Um die Anzahl von Organismen einer Gattung in einer Einzelprobe, also das Maß für die Artenvielfalt, zu bestimmen, wurden  $\alpha$ -Diversitätsschätzungen verwendet (Beule, 2018). Diese Schätzungen können auch Auskunft über die Verteilung („evenness“) von Taxa in einer Probe geben (Morgan *et al.*, 2012). Die  $\alpha$ -Diversitätsanalysen sind hilfreich in der Begutachtung von Dominanz, Seltenheit und gemeinsamen Vielfalt von Organismen. Eine häufig verwendete Messung zur Bestimmung der mikrobiellen Vielfalt ist der Chao 1-Index. Dieser gibt mithilfe bestimmter OUTs die prognostizierte Anzahl an Taxa in einer Probe an, die durch Extrapolation aus einer Anzahl von seltenen Organismen ermittelt wurde, die durch Unterabtastung ausgelassen wurden (Chao, 1984).

Die  $\beta$ -Diversitätsannäherung liefert eine Möglichkeit des Vergleiches mikrobieller Lebensgemeinschaften zwischen zwei Proben und beschreibt die Variabilität. Sie wird als Maß für den Unterschied der Artenvielfalt verstanden (Beule, 2018). Es können damit gleichzeitig Veränderungen in der Präsenz bzw. Abwesenheit oder die Abundanz tausender Taxa in einem mikrobiellen Datensatz verglichen werden. Darin wird zusätzlich zusammengefasst, wie gleich bzw. wie verschieden zwei Proben sind. Jede Probe wird mit jeder anderen Probe verglichen, wodurch eine Abstandsmatrix erstellt wird. Diese Abstände können mit unterschiedlichen Methoden berechnet werden. Dies kann in einem zweidimensionalen Plot, in dem jeder Punkt auf dem Graphen das gesamte Mikrobiom auf einer Einzelprobe repräsentiert, dargestellt werden. Jede Achse spiegelt das Prozent der Abweichung zwischen den Proben mit der x-Achse wider und repräsentiert das größte Ausmaß der Variation. Die y-Achse repräsentiert das zweitgrößte Ausmaß der Variation. Die  $\beta$ -Diversität wird hier als Bray-Curtis Index angegeben. Der Bray-Curtis Index gibt die Zusammensetzung der Verteilung zweier Proben an und liegt zwischen 0 und 1, wobei 0 die gleiche Zusammensetzung und 1 keinerlei Gemeinsamkeiten anzeigt (Larsen *et al.*, 2015).

In Abb. 44 sind die Analysen der Biodiversitäten von WT Tieren nach Eisencitrat bzw. Häm-Eisen an Tag -3, 21, 85 und 162 dargestellt. In Teilabbildung A ist die  $\alpha$ -Diversität mittels Chao1-Index angegeben. Vor Versuchsbeginn an Tag -3, d.h. drei Tage bevor, die Tiere mit den Spezialdiäten gefüttert wurden, konnten keine Unterschiede im Chao1-Index zwischen den beiden Diäten gemessen werden. Bereits nach 21 Tagen verringerte sich die  $\alpha$ -Diversität nach diätischem Häm-Eisen von durchschnittlich 117 nach Eisencitrat signifikant auf 54, was einer Abnahme um ca. 50 % entspricht. Diese signifikante Reduktion der  $\alpha$ -Diversität blieb auch nach 85 Tagen und 162 Tagen bestehen und liegt dabei zwischen 50 und 60 % des Kontrollniveaus nach Eisencitrat. Somit bewirkte Häm-Eisen eine signifikante Reduktion der prognostizierten Anzahl an Taxa.

Die Verteilung des Mikrobioms von WT Mäusen nach Eisencitrat und Häm-Eisen bezogen auf die  $\beta$ -Diversität wurde mithilfe des Bray-Curtis Index angegeben (Abb. 44 B). An Tag -3 bestand eine sehr hohe Ähnlichkeit der Zusammensetzung des Mikrobioms in beiden Gruppen, da die Tiere noch das gleiche Futter (Standardfutter) erhielten. Bereits eine 21-tägige Fütterung der Mäuse mit unterschiedlichen Diäten resultierte in einer deutlich veränderten mikrobiellen Zusammensetzung und damit größeren Abweichung der Ähnlichkeiten. Dieser Effekt wurde durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Proben nach Häm-Eisen im Vergleich mit mit Eisencitrat-gefütterten Tieren sowohl nach 85 als auch nach 162 Tagen bestätigt.

Die Häm-Eisen-haltige Diät änderte somit sowohl die Anzahl der Taxa als auch die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms von WT Mäusen signifikant.



**Abbildung 44: Analyse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität in WT Mäusen.**

Die Tiere wurden 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die bakterielle DNA wurde aus Stuhlpellets der angegebenen Zeitpunkte isoliert und die  $\alpha$ - (A) bzw.  $\beta$ - (B) Diversität bestimmt. A) Chao1-Index der  $\alpha$ -Diversität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und die statistische Analyse erfolgte mithilfe Student's t-Test. ns=nicht signifikant; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. B) Bray-Curtis Index der  $\beta$ -Diversität. Gezeigt werden die Einzelwerte (n=5).

Die Häufigkeitsverteilungen der intestinalen Mikrobiotastämme nach -3, 21, 85 und 162 Tagen Fütterung sind in Abb. 45 A dargestellt. Zu den häufigsten Vertretern zählen die *Bacteroidetes* und *Firmicutes* und in geringerer Anzahl die *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Deferribacteres*. An Tag -3 zeigten sich bereits Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms, trotz des identischen Futters (Standardfutter). Allgemein wurden bereits vor Start der Fütterungsexperimente (Tag -3) deutlich mehr *Bacteroidetes* in der potenziellen Häm-Eisengruppe (ca. 76,7 %) im Vergleich zu der potenziellen Eisencitratgruppe (ca. 56,3 %) dokumentiert. Trotz der gleichen Futterbedingungen wurden auch Unterschiede in der Anzahl der *Firmicutes*-Stämme beobachtet. Die künftigen Mäuse der Eisencitratgruppe wiesen im Durchschnitt 39,3 % *Firmicutes* auf, während es bei der künftigen Häm-Eisengruppe ca. 20,6 % waren (Abb.45 A). Diese basalen Diskrepanzen könnten aufgrund von Stressfaktoren, wie dem Transport der Tiere, entstanden sein, die durch eine längere Akklimatisierungsphase ausgeglichen werden könnten.

Trotz der großen basalen Unterschiede wurden während des Versuchsablaufs deutliche Häm-Eisen-vermittelte Unterschiede dokumentiert (Abb. 45 A). Die gramnegativen

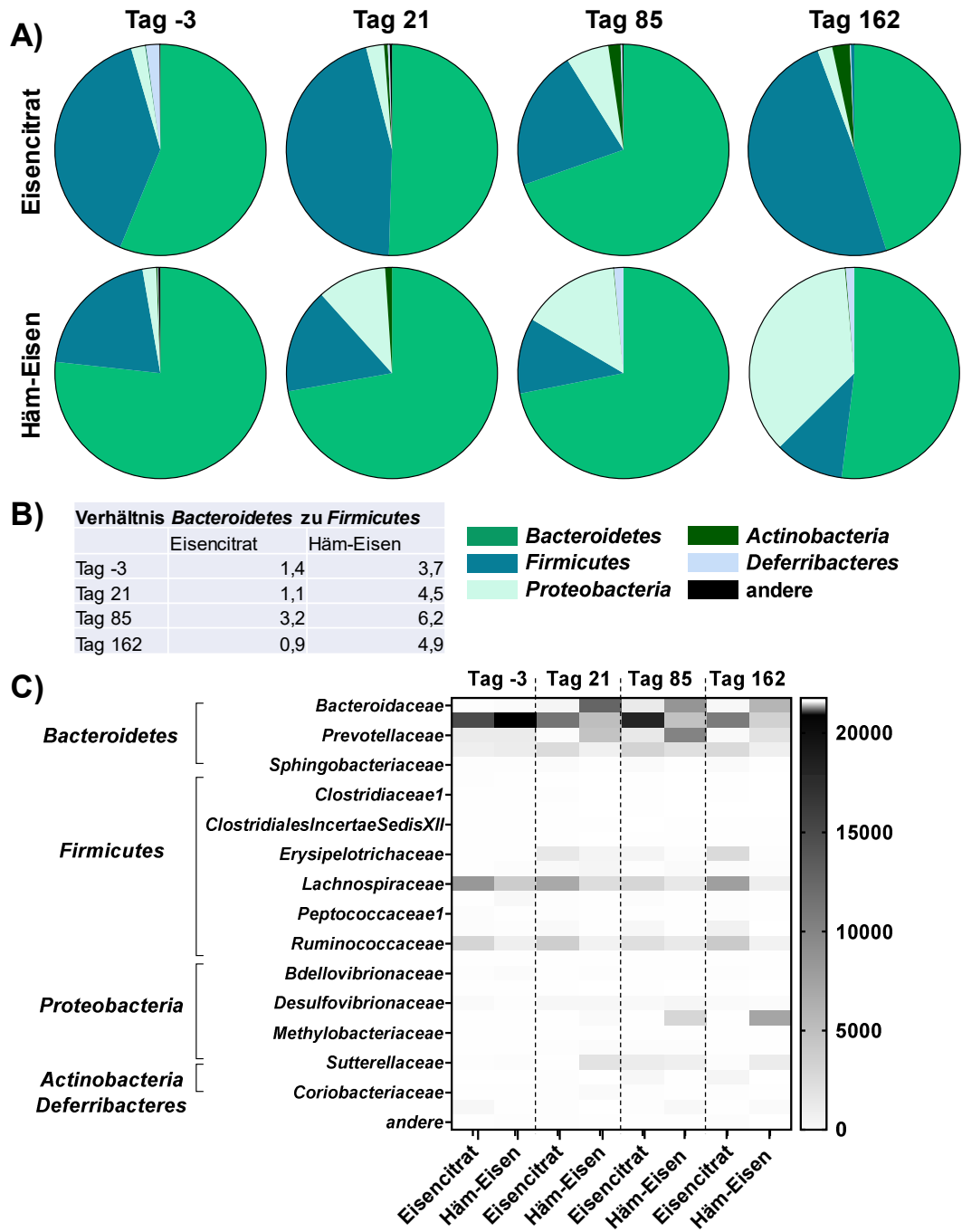
*Bacteroidaceae* nahmen nach 21 Tagen Eisencitratdiät ein Kontrollniveau von ca. 51 % ein, das nach Häm-Eisen ca. 72 % des Gesamtmikrobioms ausmachte. Die Eisencitratdiät bewirkte eine Normalisierung sowohl der Abundanz der *Bacteroidetes* als auch der grampositiven *Firmicutes*-Stämme im Vergleich zu den Werten an Tag -3. Nach der 21-tägigen Eisencitratdiät normalisierte sich das Vorkommen der *Firmicutes* auf 46 % und reduzierte sich deutlich auf 16 % durch die Häm-Eisendiät. Deutliche Unterschiede zeigten sich auch in der Häufigkeit der gramnegativen *Proteobacteria*. An Tag -3 wurden in beiden Gruppen ca. 2 % *Proteobacteria*-Stämme dokumentiert, die nach 21 Tagen Eisencitrat auf durchschnittlich 2,8 % und nach Häm-Eisen auf ca. 10,7 % anstiegen. Nach 85 Tagen Spezialdiät wurden die deutlichsten Unterschiede zwischen den Diäten im Vergleich zu den Bedingungen vor Start der Fütterung (Tag -3) in den *Proteobacteria* beobachtet (Abb. 45 A).

Verglichen mit den Werten an Tag -3 resultierte hier die Eisencitratdiät in einer moderaten Zunahme der *Proteobacteria* auf ca. 6,6 %, die nach Häm-Eisen deutlich auf ca. 15 % anstiegen. Auch die Abundanz der grampositiven *Actinobacteria*-Stämme ändert sich nach 85 Tagen Häm-Eisendiät. Die Anzahl dieser Bakterien nahm von durchschnittlich 2 % nach Eisencitrat auf ca. 0,05 % nach Häm-Eisen ab und unterschied sich damit von den basalen Levels an Tag -3 (Abb. 45 A).

Nach 162 Tagen war die Änderung der mikrobiellen Zusammensetzung durch Häm-Eisen am deutlichsten in den *Firmicutes* (ca. 48 % nach Eisencitrat, ca. 11 % nach Häm-Eisen) und den *Proteobacteria* (ca. 2 % nach Eisencitrat, ca. 36 % nach Häm-Eisen) zu beobachten. Des Weiteren zeigte die Langzeitfütterung mit Häm-Eisen einen deutlichen Einfluss auf die Häufigkeit der *Actinobacteria*-Stämme, die von ca. 0,13 % nach Eisencitrat auf ca. 3 % anstieg (Abb. 45 A).

Ein wichtiges Maß einer Dysbiose des intestinalen Mikrobioms ist das Verhältnis zwischen *Bacteroidetes*- und *Firmicutes*-Stämmen. Je höher der Quotient, desto mehr ist das intestinale Mikrobiom im Ungleichgewicht (Constante *et al.*, 2017; Winter *et al.*, 2014a). Am deutlichsten ist dieses dysbiotische Verhältnis an Tag 21 und 162 ausgeprägt (Abb. 45 B). Nach 21 Tagen Eisencitrat errechnete sich ein Verhältnis von 1,1, welches durch die Häm-Eisendiät auf einen Wert von 4,5 anstieg. Vergleichbare Unterschiede zeigten die Berechnungen an Tag 162. Hier bewirkte die Eisencitratdiät ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* (0,9), welches nach der Häm-Eisen-haltigen Diät auf 4,8 anstieg. In Abb. 45 C ist die taxonomische Analyse der intestinalen Bakterien in einer *Heat-map*-Darstellung nach den Spezialdiäten angegeben. Diese Darstellung

repräsentiert die Abundanz der Bakterienfamilien im Mikrobiom wildtypischer Mäuse nach -3, 21, 85 und 162 Tagen Fütterung.



**Abbildung 45: Einfluss von Häm-Eisen auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms.**

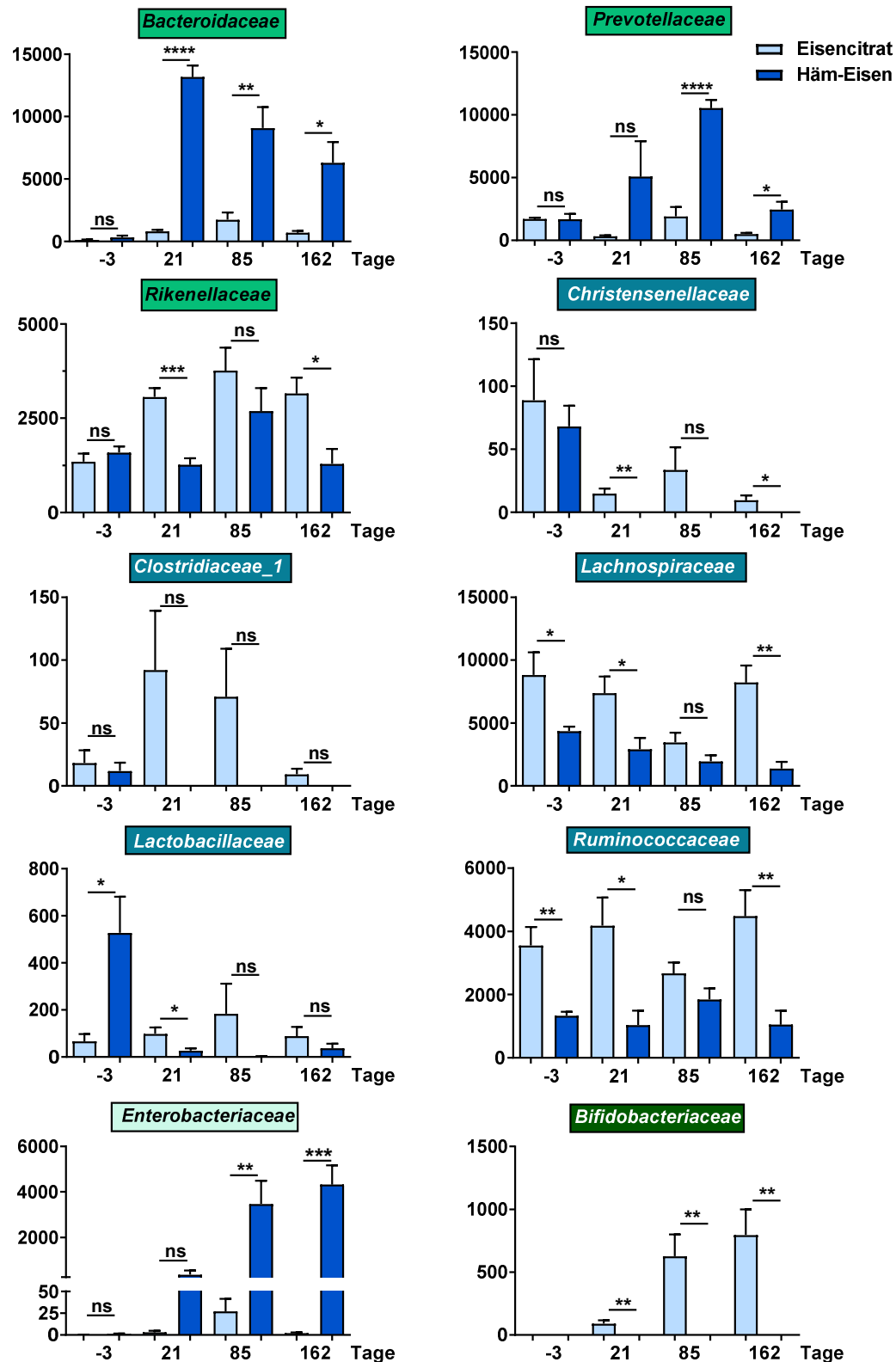
Stuhlproben von WT Tieren wurden an den angegebenen Zeitpunkten gesammelt. Bakterielle DNA wurde isoliert und das Mikrobiom mittels 16S rRNA sequenziert. A) Verteilungsdiagramme der intestinalen Zusammensetzung der Bakterienstämme. B) Verhältnis der *Bacteroidetes* zu *Firmicutes*. C) Klassifizierung der Bakterienfamilie. Die Anzahl der intestinalen Bakterienfamilien ist als absoluter Wert mittels *Heat-map*-Diagramm dargestellt (n=5).



Eine genauere Klassifizierung der Taxa nach den unterschiedlichen Diäten ist in Abb. 46 dargestellt. Es werden im Folgenden die Bakterienfamilien mit den deutlichsten Unterschieden in ihrer Präsenz nach Häm-Eisen im Vergleich zu Eisencitrat aufgelistet. Innerhalb der *Bacteroidetes* zeigten die *Bacteroidaceae* und die *Prevotellaceae* die deutlichste Zunahme nach Häm-Eisen im Vergleich zu Eisencitrat. Während vor Start der Fütterungsstudie (Tag -3) in beiden Taxa eine vergleichbare Anzahl beobachtet wurde, zeigten sich bereits nach 21 Tagen deutliche Unterschiede zwischen den Diäten, die über die Zeit in signifikanten Zunahmen nach Häm-Eisen resultierten. Eine weitere Familie innerhalb der *Bacteroidetes* stellt die *Rikenellaceae* dar. Diese nahmen nach der Häm-Eisendiät in ihrer Abundanz ab.

Alle hier analysierten *Firmicutes*-Stämme zeigten eine deutliche Reduktion nach diätischem Häm-Eisen. Diese *Firmicutes*-Stämme beinhalten die *Christensenellaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* und *Ruminococcaceae* (Abb. 46).

Auch die grampositiven *Bifidobacteriaceae* wurden negativ durch diätisches Häm-Eisen reguliert, was sich bereits nach 21 Tagen in signifikanten Unterschieden im Vergleich zu Eisencitrat widerspiegelte. Im Gegensatz dazu nahmen innerhalb der *Proteobacteria* die *Enterobacteriaceae* deutlich nach Häm-Eisen verglichen mit Eisencitrat zu. Hier wurde zudem eine Steigerung der Gesamtanzahl der *Enterobacteriaceae* über die Zeit auch nach Eisencitrat beobachtet (Abb. 46).



**Abbildung 46: Taxonomische Analysen des intestinalen Mikrobioms in WT Mäusen.**

Die Mäuse wurden 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die bakterielle DNA wurde aus Stuhlproben zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die Mikrobiomzusammensetzung bestimmt. Dargestellt sind die absoluten Bakterienzahlen als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und die statistische Analyse erfolgte mit Student's t-Test. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

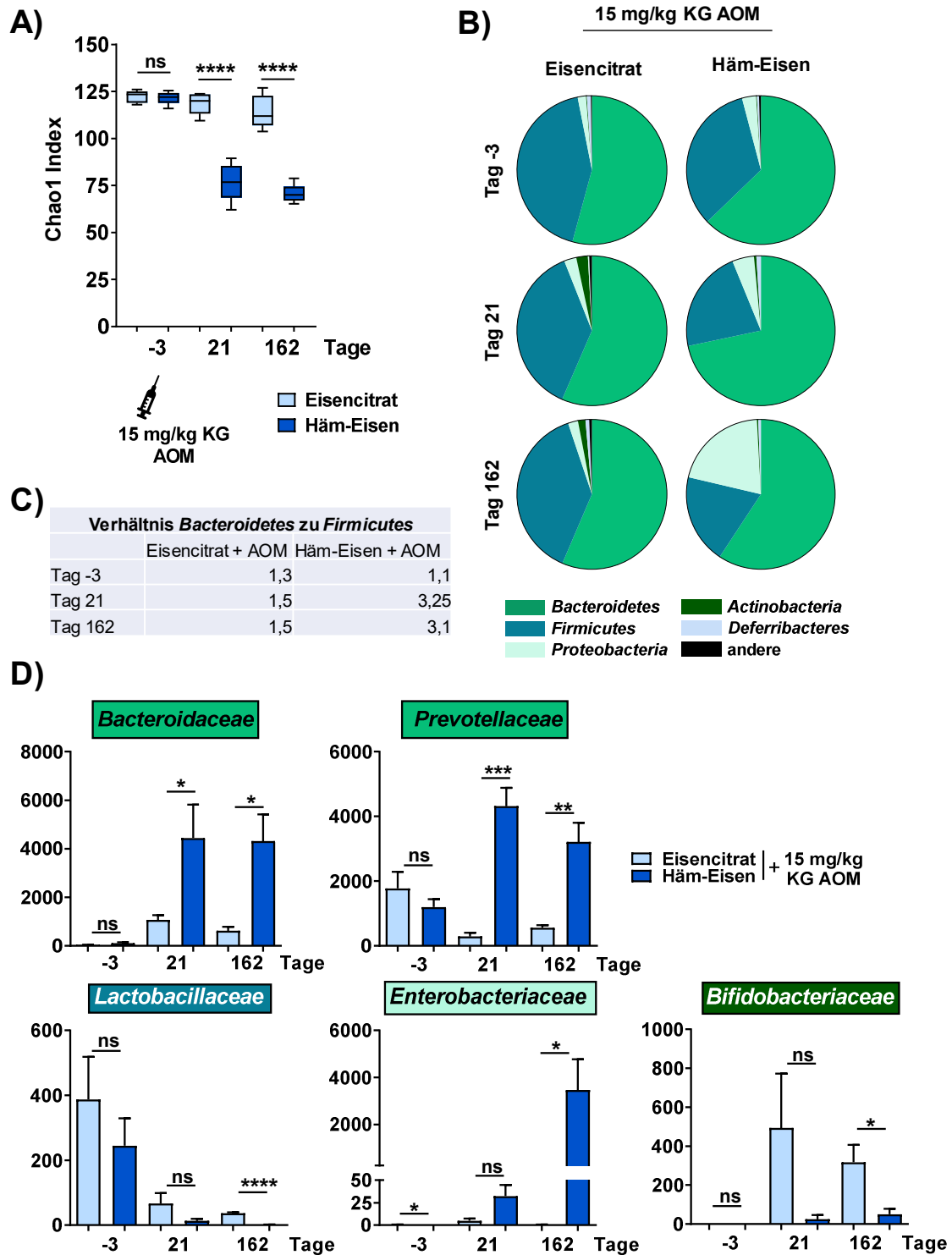
Es wurden zusätzlich die Veränderungen der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms in WT Mäusen analysiert, denen vor der Langzeitfütterung 15 mg/kg KG AOM *i.p.* injiziert wurde. Auch hier erhielten die Mäuse eine Spezialdiät über 162 Tage und Kotproben wurden an den Tagen -3, 21 und 162 gesammelt (3.16).

In Abb. 47 sind die Ergebnisse der Mikrobiomanalysen nach initialer AOM-Gabe und Langzeitdiät dargestellt. Die  $\alpha$ -Diversität (Abb. 47 A) wurde als Chao1-Index angegeben. Während dieser vor Gabe der verschiedenen Spezialdiäten (Tag -3) keine Unterschiede innerhalb der Gruppen zeigte, konnten nach 21 und 162 Tagen signifikante Abnahmen der  $\alpha$ -Diversität nach Häm-Eisen dokumentiert werden. An Tag 21 wurde eine Reduktion der  $\alpha$ -Diversität von ca. 119 nach Eisencitrat auf ca. 77 nach Häm-Eisen beobachtet, was einer Reduktion um 65 % entspricht. Die Analysen an Tag 162 verdeutlichten diese Persistenz eines Häm-Eisen-vermittelten Chao1-Indexes. Die Eisencitratdiät bewirkte an diesem Zeitpunkt einen Chao1-Index von ca. 114, der nach der Häm-Eisendiät signifikant auf einen Wert von ca. 71 (Reduktion um ca. 62 %) sank.

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Diversität sind in Abb. 65 im Anhang als Bray-Curtis-Index dargestellt. Auch hier zeigte sich eine Häm-Eisen-induzierte Veränderung der intestinalen Mikrobiota über einen Zeitraum von 162 Tagen. Unabhängig von einer vorangegangenen AOM-Injektion bewirkte Häm-Eisen eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Diversität und  $\beta$ -Diversität, wie sowohl die Ergebnisse nach der PBS- als auch nach der AOM-Injektion verdeutlichen (Abb. 44, 47, Abb. 65 im Anhang).

Abb. 47 B visualisiert die Verteilung der Bakterienphyla nach Eisencitrat- und Häm-Eisendiät im Stuhl AOM-initiiertter WT Mäuse. An Tag -3, also vor der AOM-Injektion sind keine bedeutenden Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der einzelnen Gruppen erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt erhielten alle Mäuse das Standardfutter.

Bereits nach 21 Tagen Fütterung mit den Spezialdiäten waren deutliche Unterschiede der bakteriellen Zusammensetzung auch im Vergleich zu der basalen Zusammensetzung (Tag -3) quantifizierbar. Die Anzahl der *Bacteroidetes* wurde durch Häm-Eisen (ca. 72 %), verglichen mit der Anzahl nach Eisencitrat (ca. 57 %), deutlich gesteigert. Im Gegensatz dazu zeigten die Vergleiche der *Firmicutes* nach Häm-Eisen eine Reduktion der Abundanz von ca. 38 % nach Eisencitrat auf 22 %. Während die Anzahl der *Actinobacteria* nach 21 Tagen Eisencitrat im Vergleich zur basalen Anzahl (Tag -3) von ca. 0,2 % auf ca. 2,5 % anstieg, resultierte die Häm-Eisendiät nach 21 Tagen Fütterung in einer Reduktion auf ca. 0,5 %. Nach 162 Tagen wurde die Anzahl der *Firmicutes* von ca. 38 % nach Eisencitrat auf knapp 19 % durch Häm-Eisen reduziert und die Anzahl der *Bacteroidetes* leicht von ca. 56 % nach Eisencitrat auf ca. 59 % durch Häm-Eisen erhöht.



**Abbildung 47: Einfluss von Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom in AOM-behandelten Mäusen.**

Den Tieren wurde vor Versuchsbeginn AOM (15 mg/kg KG) injiziert und 162 Tage Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die bakterielle DNA wurde aus Stuhlpellets der angegebenen Zeitpunkte isoliert. A) Chao1-Index der  $\alpha$ -Diversität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe *Student's* t-Test. ns=nicht signifikant; \*\*\*\*p<0,0001. B) Verteilungsdiagramme der intestinalen Zusammensetzung der Bakterienstämme. C) Verhältnis der *Bacteroidetes*-zu-*Firmicutes*-Rate. D) Taxonomische Analysen. Dargestellt sind die absoluten Bakterienzahlen als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und die statistische Analyse erfolgte mit *Student's* t-Test. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die bereits nach 21 Tagen beobachtete Zunahme der *Proteobacteria* nach Häm-Eisen wurde nach 162 Tagen offensichtlich. Hier stieg die Anzahl der *Proteobacteria* durch diätisches Häm-Eisen von ca. 2 % nach Eisencitrat auf 20 %.

Ähnlich den Ergebnissen nach der Häm-Eisendiät ohne vorherige AOM-Injektion, lässt sich auch in Kombination mit AOM ein deutlicher Häm-Eisen-bedingter Anstieg des Verhältnisses zwischen *Bacteroidetes* zu *Firmicutes* identifizieren (Abb. 47 C). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Eigenschaft von Häm-Eisen, eine Dysbiose innerhalb des intestinalen Mikrobioms zu induzieren. Während an Tag -3 keine Unterschiede der Verhältnisse (1,1-1,3) beobachtet wurden, bedingte Häm-Eisen nach 21 Tagen einen deutlichen Anstieg dieses Verhältnisses von 1,5 nach Eisencitrat auf 3,25, was auch nach Langzeitfütterung bestehen blieb (Tag 162: 1,5 nach Eisencitrat, 3,1 nach Häm-Eisen).

Abb. 47 D verdeutlicht die Häm-Eisen-induzierten taxonomischen Veränderungen des intestinalen Mikrobioms. Diätisches Häm-Eisen bedingte nach 21 Tagen einen signifikanten Anstieg innerhalb der *Bacteroidetes* in den *Bacteroidaceae* und *Prevotellaceae* im Vergleich zu Eisencitrat, während das basale Level (Tag -3) keine signifikanten Änderungen aufwies. Im Gegensatz dazu bewirkte die Häm-Eisendiät in den AOM-injizierten Mäusen eine bemerkenswerte Reduktion verschiedener Vertreter der *Firmicutes*. Hier wurde eine Abnahme der *Lactobacillaceae* nach 21-tägiger Fütterung mit Häm-Eisen beobachtet, die nach 162 Tagen in einer signifikanten Reduktion, verglichen mit der Eisencitratkontrolle, resultierte. Ähnliche Ergebnisse ergab der Vergleich der *Bifidobacteriaceae* innerhalb der *Actinobacteria*, die verglichen mit der Eisencitratkontrolle, stets nach Häm-Eisen in ihrer Anzahl abnahmen. Die *Enterobacteriaceae* der *Proteobacteria* wiesen einen Häm-Eisen-bedingten Anstieg auf, der im Laufe des Experiments verstärkt wurde.

Zusammenfassend lässt sich durch die Untersuchungen des Mikrobioms feststellen, dass diätisches Häm-Eisen v.a. das Wachstum der gramnegativen Bakterienstämme fördert und das der grampositiven hemmt. Dadurch kommt es zu einer intestinalen Dysbiose, die einen potenziellen Risikofaktor für Darmentzündungen darstellt oder sogar tumorpromovierende Eigenschaften aufzeigen kann. Der beobachtete Effekt von Häm-Eisen auf das Mikrobiom scheint unabhängig von einer vorherigen AOM-Injektion zu sein.

## 4.10 Rolle von Häm-Eisen bei der Tumorinitiation und Tumorprogression

### 4.10.1 Effekt einer Langzeitdiät mit Häm-Eisen auf das Kolonepithel in Abhängigkeit vom MGMT-Status

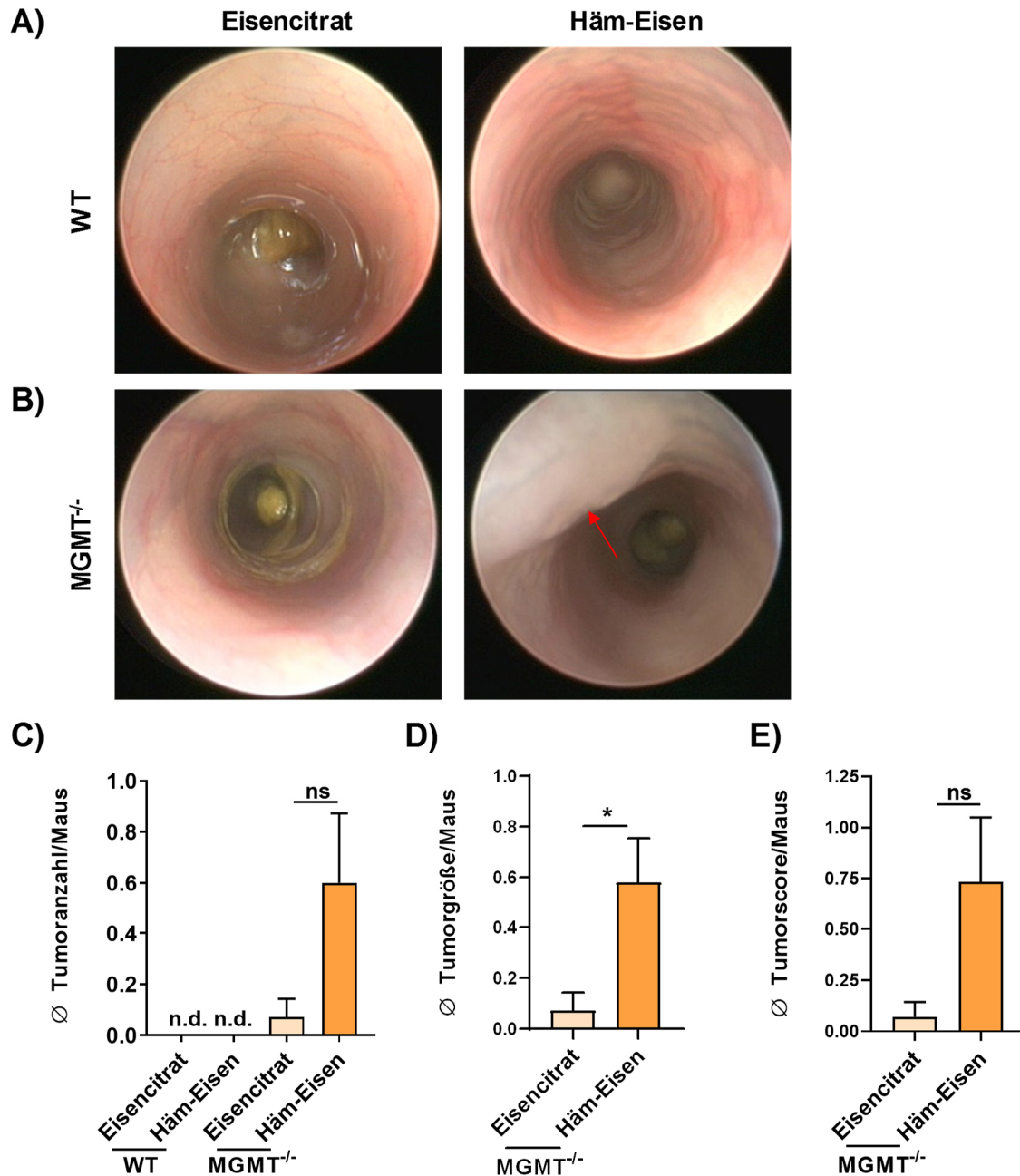
Um die Rolle von Häm-Eisen als potenziellem KRK-Initiator zu analysieren, wurden WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, über 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert.

Der Verlauf der Koloninflammation und die Tumorentstehung wurden mittels nicht-invasiver Mini-Endoskopie (3.8) an Tag 21, 56, 85, 112 und 162 analysiert. Repräsentative Aufnahmen der Mini-Endoskopie nach 162 Tagen Fütterung mit der Spezialdiät sind in Abb. 48 dargestellt. Die Koloninflammation während dieses Versuchsaufbaus wurde bereits in 4.8 genauer beschrieben und mittels MEICS in Abb. 32 quantifiziert. Das wildtypische Kolonepithel zeigte nach 162-tägiger Fütterung mit der Eisencitrat-Kontrolldiät eine hohe Transparenz der Mukosaschicht mit keiner bzw. minimalster Granularität, sowie ein reguläres Muster der Blutgefäße und kaum Fibrin (Abb. 48 A). Im Gegensatz dazu bewirkte diätisches Häm-Eisen eine verstärkte Koloninflammation mit einer reduzierten Transparenz, einer verstärkten Granularität sowie Veränderungen des vaskulären Musters. Des Weiteren stieg nach Häm-Eisen teilweise das Vorkommen von Fibrin und die Stuhlkonsistenz veränderte sich (Abb. 48 A).

Das Kolonepithel MGMT-defekter Mäuse wies nach 162 Tagen Fütterung mit Eisencitrat kaum makroskopische Veränderungen auf (Abb. 48 A). Im Unterschied dazu wurden nach einer kontinuierlichen Diät mit Häm-Eisen eine Abnahme der Transparenz des Darmepithels, ein erhöhtes Fibrinvorkommen und Veränderungen der Vaskularität beobachtet. Der Grad der Kolonentzündung in MGMT-defekten Mäusen wurde in Abschnitt 4.8 als MEICS quantifiziert. Bei der mini-endoskopischen Analyse konnten zudem v.a. nach 162 Tagen Häm-Eisendiät Kolontumore (roter Pfeil) in den MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen dokumentiert werden (Abb. 47 B).

Abb. 48 C stellt die statistische Auswertung der mittleren Tumorzahl pro Maus nach 162 Tagen Spezialdiät dar. Reparaturdefekte Mäuse bildeten eine mittlere Tumoranzahl von 0,07 nach Eisencitrat und 0,6 nach Häm-Eisen pro Maus aus. WT Mäuse zeigten im Gegensatz dazu weder nach Eisencitrat noch nach Häm-Eisen Kolontumore. Aufgrund der fehlenden Tumoranzahl der WT Mäuse konnte folglich weder Tumorgöße noch Tumorscore ermittelt werden. Die mittlere Größe der Kolontumore der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurde in Abb. 48 D quantifiziert. Hier wurde eine mittlere Tumorgöße von 0,07 nach Eisencitratdiät ermittelt, die durch Häm-Eisen signifikant auf einen Wert von

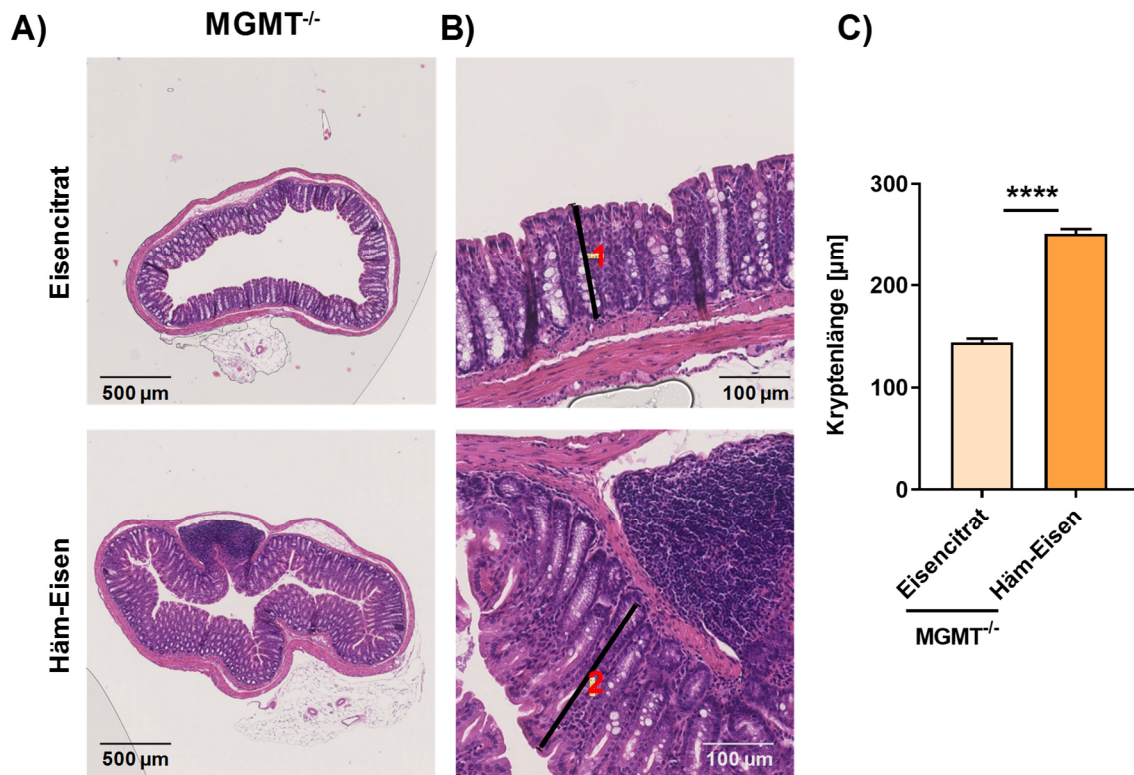
durchschnittlich 0,6 anstieg. Abb. 48 E gibt den mittleren Tumorscore an, der sich aus der Summe aller Tumore und deren Größe berechnet (Abschnitt 3.8.2). Der mittlere Tumorscore in *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen betrug nach Eisencitrat ca. 0,07 und stieg nach Häm-Eisen auf ca. 0,7 pro Maus an.



**Abbildung 48: Einfluss einer Langzeit-Häm-Eisendiät auf das Kolonepithel von WT und *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Den Tieren wurde 1x PBS *i.p.* injiziert und 162 Tage Eisencitrat bzw. Häm-Eisen gefüttert. Repräsentative endoskopische Aufnahmen von WT (A) und *MGMT*<sup>-/-</sup> (B) Tieren. Mit dem roten Pfeil ist ein Tumor dargestellt. Quantifizierung der durchschnittlichen Tumoranzahl (C), der mittleren Tumorgroße (D) und des durchschnittlichen Tumorscores (E) pro Maus. Dargestellt werden jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 14$ ) ermittelt durch *Student's t*-Test. n.d.= nicht detektierbar, ns=nicht signifikant, \* $p < 0,05$ .

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass nach einer Langzeitfütterung mit Häm-Eisen in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen eine gesteigerte Tumorinitiation beobachtet wurde. Die fehlende Reparaturkapazität der MGMT-defekten Mäuse scheint die Bildung von Kolontumoren zu begünstigen.

In Abb. 49 A sind repräsentative gescannte H&E-gefärbte Kolonschnitte nach 162 Tagen Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät MGMT-defizienter Mäuse dargestellt, deren Vergrößerung Teilabbildung B visualisiert.



**Abbildung 49: Histopathologische Veränderungen der Kolonmukosa von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren nach Langzeitdiät.**

Tiere wurden 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Repräsentative gescannte Aufnahmen von H&E-gefärbten Kolonschnitten (A) und deren Vergrößerung (B) dargestellt mit NDP.view2. C) Evaluation der Kryptenlänge. Dargestellt werden jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, je 6 Aufnahmen). Die Kryptenlängen sind als schwarzes Lineal in den vergrößerten Aufnahmen angegeben (1:161 µm; 2: 249 µm). Statistische Auswertung ermittelt durch Student's t-Test, \*\*\*\*p<0,001.

Histopathologische Analysen wurden von [REDACTED] durchgeführt. Diese ergaben sowohl nach Eisencitrat- als auch nach Häm-Eisendiät eine kryptär gegliederte Kolonmukosa mit einem leicht reduzierten Becherzellgehalt und diskreter Hyperchromasie. Eine Hyperchromasie beschreibt eine verstärkte Anfärbbarkeit überwiegend von Zellkernen, was ein Marker für u.a. Entzündungsprozesse ist (Erben *et al.*, 2014). Während die Kolonkrypten der Eisencitrat-gefütterten Kontrollmäuse relativ kurz und gleichmäßig angeordnet sind, zeigt sich nach

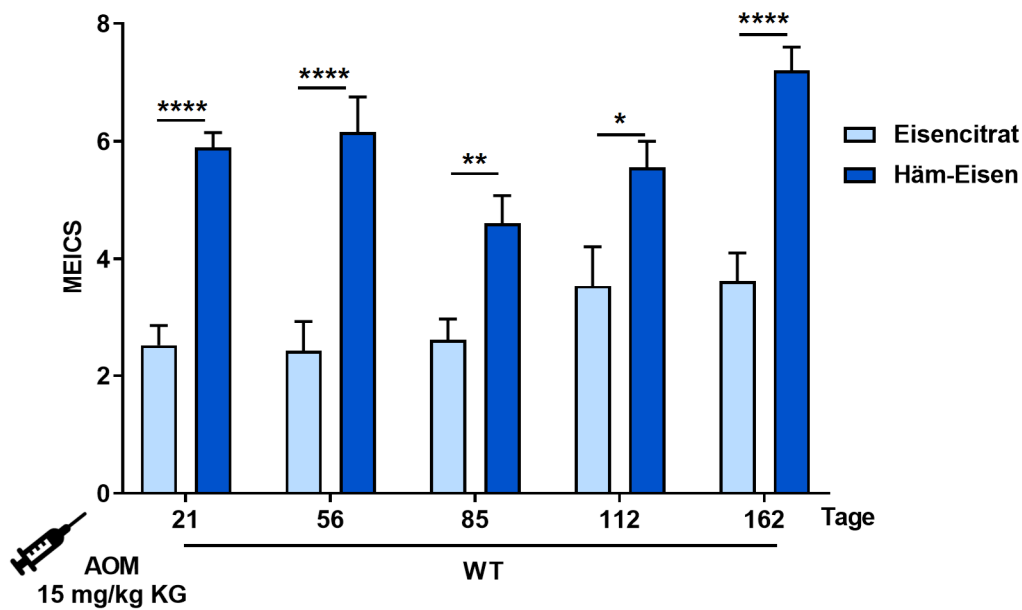


Häm-Eisen eine deutliche Kryptenelongation, die ein Parameter für ein entzündungsassoziiertes Ödem bzw. Infiltrat ist, wodurch die Schleimhaut anschwillt (Erben *et al.*, 2014). Nach Eisencitrat wurde eine durchschnittliche Kryptenlänge von 143,8 µm gemessen, die nach Häm-Eisen auf durchschnittlich 250,9 µm ansteigt. Abb. 49 B visualisiert exemplarisch die Kryptenlänge. Vergrößert dargestellt ist ein Teil eines Lymphfollikels, der in der LP lokalisiert ist. Dieser beinhaltet meist eine große Anzahl an B-Zellen, die sich dort zu Plasmazellen differenzieren. Ein solcher Lymphfollikel könnte für eine Häm-Eisen-vermittelte Immunantwort sprechen.

#### 4.10.2 Einfluss von Häm-Eisen auf die Promotion von Kolontumoren in WT Mäusen

Zur Analyse des Tumorpromotionspotenzials wurde wildtypischen Mäusen, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, initial 15 mg/kg KG AOM *i.p.* injiziert und 72 h nach der Injektion eine Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät über 162 Tage gefüttert. Die Koloninflammation wurde in regelmäßigen Abständen (Tag 21, 56, 85, 112, 162) mittels Mini-Endoskopie beobachtet und als MEICS bestimmt (3.8.1).

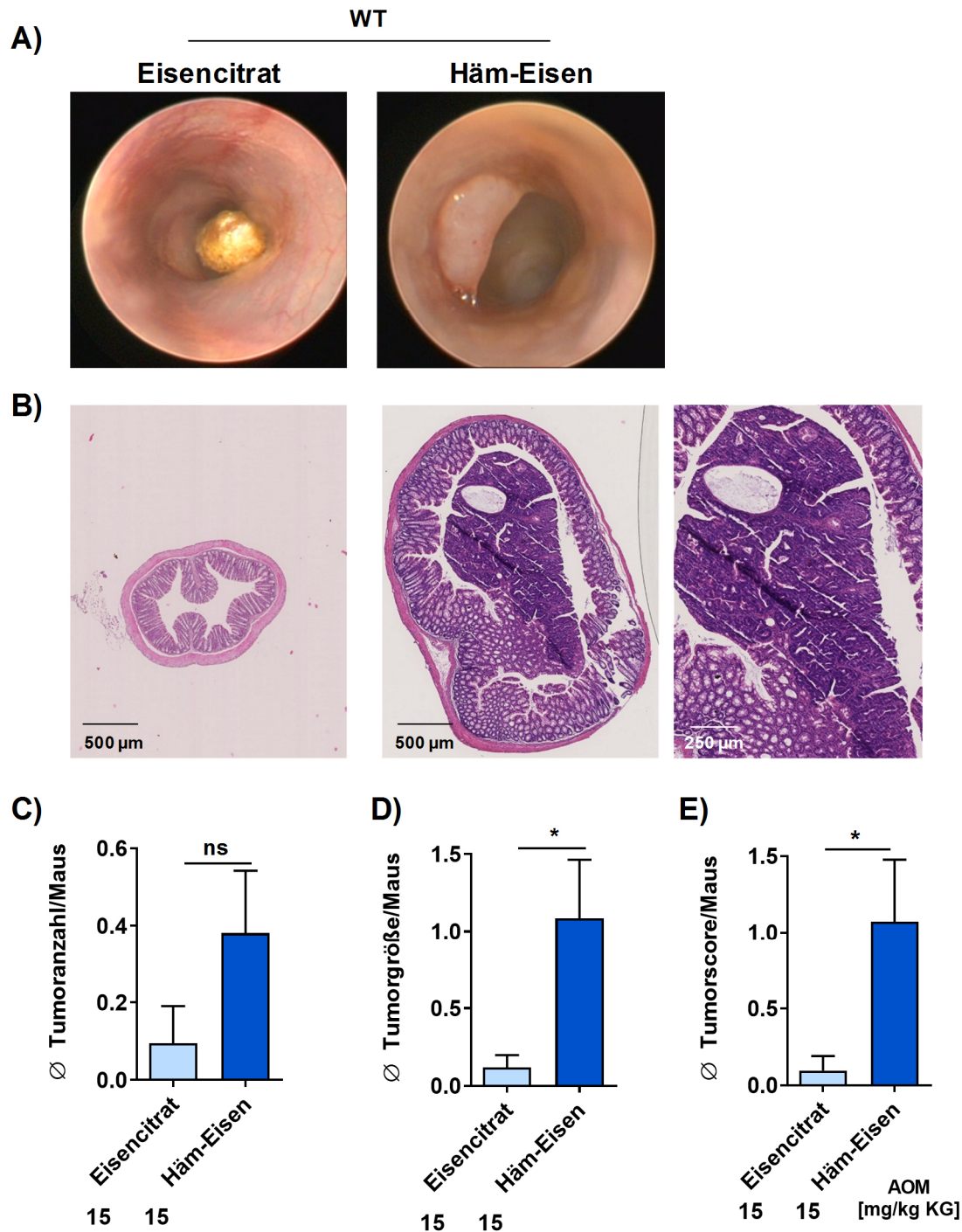
In Abb. 50 ist die statistische Auswertung der MEICS nach AOM-Gabe in Kombination mit den Spezialdiäten nach unterschiedlichen Zeitpunkten dokumentiert. Zu allen Zeitpunkten resultierte Häm-Eisen in einem signifikanten Anstieg der Kolonentzündung. Anfangs wurden durch die Eisencitratdiät MEICS zwischen 2,4 und 2,6 beobachtet, die ab Tag 112 moderat auf Durchschnittswerte zwischen 3,5 und 3,6 anstieg. Der MEICS zeigte nach Häm-Eisenfütterung bereits nach 21 Tagen eine signifikante Zunahme im Vergleich zu Eisencitrat. Auch nach initialer AOM-Gabe resultierte Häm-Eisen in einer chronischen Kolonentzündung mit durchschnittlichen MEICS zwischen 4,6 und 7,2.



**Abbildung 50: MEICS von AOM-injizierten WT Mäusen nach Langzeitfütterung.**

Die Tiere wurden nach AOM-Injektion (15 mg/kg KG) mit Eisencitrat und Häm-Eisen für 162 Tage gefüttert und die Darmentzündung mittels Mini-Endoskopie und MEICS an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 18$ ) deren statistische Analyse mithilfe des *Student's t-Test* erfolgte. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Der zuvor beschriebene Häm-Eisen-vermittelte Anstieg der Koloninflammation nach 162 Tagen Fütterung mit vorheriger AOM-Injektion kann anhand der repräsentativen miniendoskopischen Aufnahmen in Abb. 51 A genauer beschrieben werden. Im Kolon der Eisencitrat-gefütterten Mäuse waren bereits leichte Veränderungen des vaskulären Musters und eine leicht eingeschränkte Transparenz des Kolonepithels zu beobachten. Neben der drastischen Verschlechterung der Transparenz des Kolonepithels wurden nach Häm-Eisen eine verstärkte Granularität sowie mehr Fibrin dokumentiert. Häm-Eisen resultierte zudem in einem deutlich veränderten vaskulären Muster. Anhand dieser Entzündungsparameter errechnete sich nach Häm-Eisen ein signifikant erhöhter MEICS im Vergleich zu Eisencitrat (Abb. 50). Zusätzlich wurden im Kolonlumen wildtypischer Mäuse nach initialer AOM-Gabe mit anschließender Häm-Eisendiät mehr Kolontumore als nach Eisencitrat beobachtet (Abb. 51 C).



**Abbildung 51: Effekt einer Langzeitfütterung mit Häm-Eisen auf das Kolonepithel AOM-initiiertter WT Mäuse.**

Die Tiere wurden mit 15 mg/kg KG AOM injiziert und anschließend mit Eisencitrat oder Häm-Eisen 162 Tage gefüttert. A) Repräsentative Bilder einer Mini-Endoskopie. B) Gescannte Schnitte einer H&E-Färbung des murinen Kolongewebes und die vergrößerte Darstellung eines Tumors nach Häm-Eisen, dargestellt mithilfe von NDP.view2. Durchschnittliche Anzahl von Kolontumoren (C), Durchschnittstumorgroße (D) und mittlerer Tumorscore pro Maus (E). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $\geq 21$ ) angegeben und wurden statistisch mittels Student's t-Test analysiert. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ .

Nach 162 Tagen Fütterung mit Eisencitrat sind durchschnittlich 0,1 Tumore pro Maus quantifizierbar, wohingegen die Häm-Eisendiät einen Anstieg auf ca. 0,4 Tumore pro Maus bewirkte, der allerdings nicht signifikant war (Abb. 51 C). Die mittlere TumorgroÙe pro Maus ist in Abb. 51 D angegeben. Hier bewirkte die Eisencitratdiät eine durchschnittliche TumorgroÙe von 0,1, die nach Häm-Eisen signifikant auf durchschnittlich 1,1 stieg. Auch hinsichtlich des mittleren Tumorscores wurde nach Häm-Eisendiät ein signifikanter Anstieg auf ca. 1,1 im Vergleich zu 0,1 nach Eisencitrat dokumentiert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass nach initialem DNA-Schaden, der hier durch die *i.p.* Gabe von AOM gesetzt wurde, Häm-Eisen einen fördernden Einfluss auf die Progression kolorektaler Tumore hat.

## 5. Diskussion

### 5.1 Intestinale Aufnahme von Häm-Eisen in das murine Kolonepithel

Die Eisenaufnahmeraten nach einer 21-tägigen Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät in das Kolonepithel wildtypischer und MGMT-defekter Mäuse wurden mittels ICP-MS/MS bestimmt. Im Kolonepithel beider Genotypen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diäten beobachtet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Eisen aus beiden Diäten in vergleichbaren Mengen ins Kolonepithel aufgenommen wird. Die Eisenaufnahme aus der Nahrung und dessen Verteilung hängt von unterschiedlichen zellulären Transportmechanismen ab. Abhängig davon, ob Nicht-Häm-Eisen oder Häm-Eisen in die Enterozyten transportiert werden soll, gibt es verschiedene Transportmechanismen. Der Metalltransporter DMT 1 ist für die Aufnahme von anorganischem bzw. Nicht-Häm-Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) verantwortlich. Der genaue Transportmechanismus von Häm-Eisen in die Enterozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Der Transport könnte über das Häm-Transportprotein HCP-1 oder durch eine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen (Geissler *et al.*, 2011; Latunde-Dada *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2006; Shayeghi *et al.*, 2005).

Zudem ist der Ort der Absorption von Häm- und Nicht-Häm-Eisen aus Nahrungsmitteln innerhalb des Gastrointestinaltrakts noch nicht gänzlich entschlüsselt. Während ältere Studien von Young und Kollegen auf eine Aufnahme von Häm-Eisen v.a. im Kolon hindeuten, legen neue Studien eine überwiegend im Duodenum ablaufende Eisenabsorption nahe (Geissler *et al.*, 2011; Gulec *et al.*, 2014; Young *et al.*, 1989). Die Verfügbarkeit von diätischem Eisen für die Aufnahme durch die Darmmukosa ist von der chemischen Form des Eisens (Häm- oder Nicht-Häm-Eisen) und der Komplexbildung des Eisens mit anderen diätischen Zusätzen abhängig (Geissler *et al.*, 2011). Die Bioverfügbarkeit von Nicht-Häm-Eisen, besonders die des unlöslichen dreiwertigen Eisens, ist durch viele diätische Faktoren beeinflussbar. Bevor Nicht-Häm-Eisen in die duodenalen Enterozyten aufgenommen werden kann, muss es zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert werden. Dies wird über die in der Bürstensaummembran gebundene Ferrireduktase DcytB bewerkstelligt (Conrad *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2000; Hallberg *et al.*, 1989). Es ist demnach anzunehmen, dass Häm-Eisen nicht vollständig absorbiert wird und weiterhin luminal vorliegt. Bereits frühere Studien dokumentierten in Tierstudien erhöhte Mengen an fäkalem Häm nach einer Häm-Eisen-angereicherten Diät, die auch für die Schäden im Kolonlumen verantwortlich sein könnten (Constante *et al.*, 2017).

Als indirekter Marker für die Häm-Aufnahme wurde zusätzlich das Häm-degradierende Enzym HO-1 immunhistologisch im Kolonepithel nachgewiesen. Die Analysen zeigten eine

spezifische Induktion von HO-1 durch Häm-Eisen, jedoch nicht durch Eisencitrat (Abb. 19). Übereinstimmend damit wurde in vorherigen Studien nach diätischem Häm-Eisen eine Induktion von HO-1 im Kolonepithel nachgewiesen (Ijssennagger *et al.*, 2015; Ijssennagger *et al.*, 2012a). Mithilfe von *in vitro*-Analysen wurde gezeigt, dass Hämoglobin eine Expressionssteigerung sowie die nukleare Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 (*nuclear transcription factor-erythroid 2-related factor*) induziert. Nrf2 spielt eine Schlüsselrolle als Regulator in der zellulären Abwehr gegenüber oxidativem Stress und führt zu einer Expressionssteigerung von HO-1, welche wiederum die ROS-Akkumulation und die Apoptoserate reduziert (Yang *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, durch die spezifische Aufnahme der unterschiedlichen Eisenformen ins Kolonepithel, die adäquate Verwendung der eingesetzten Eisencitratkontrolle im Vergleich zu Häm-Eisen. Somit können die beobachteten Effekte nach der Häm-Eisendiät auf dieses zurückgeführt und ein allgemeiner Effekt von Eisen ausgeschlossen werden.

## 5.2 Häm-Eisen fördert fäkale ATNCs mit potenzieller O<sup>6</sup>-MeG-Bildung im Kolon

In dieser Arbeit wurde ein Anstieg der fäkalen ATNCs in beiden Genotypen nach einer Langzeitfütterung mit Häm-Eisen verglichen mit der Eisencitratdiät über einen Zeitraum von 162 Tagen beobachtet (Abb. 20). Der Großteil der durch Häm-Eisen-induzierten ATNCs sind die fäkalen RNNOs, die in WT Mäusen nach Langzeitfütterung und bei fehlender MGMT-Reparaturkapazität bereits nach 21 Tagen signifikant erhöht waren (Abb. 20).

Eine genaue Betrachtung ergab, dass Häm-Eisen die Bildung fäkaler Fe-NOs, jedoch nicht die der RSNOs fördert. Die Analyse dieser fäkalen Fe-NOs zeigte bereits nach 21 Tagen Häm-Eisen einen signifikanten Anstieg in den Fäzes MGMT-defekter Mäuse (Abb. 20). Diese Signifikanzen in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21-tägiger Diät kommen aufgrund der geringeren Standardabweichungen der konsistenteren Ergebnisse. Es wurde ein vergleichbares Level fäkaler ATNCs nach Häm-Eisenfütterung in beiden Genotypen beobachtet.

Auffällig waren die signifikant höheren Mengen der RNNOs nach der Langzeitfütterung mit Häm-Eisen in beiden Genotypen verglichen mit den Werten nach der Eisencitratdiät. Dieses Ergebnis deutet auf eine verstärkte endogene Bildung v.a. der N-Nitrosoverbindungen (RNNOs) nach diätischem Häm-Eisen hin und steht im Einklang zu früheren Studien (Bastide *et al.*, 2011; Bingham *et al.*, 2002; Cross *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit dieser Doktorarbeit zeigten frühere *in vivo*-Fütterungsstudien mit

hohen Mengen Hämoglobin (ca. 1,5 µmol Häm/g Diät) einen Anstieg fäkaler ATNCs mit einer ausgeprägten Bildung von Fe-NOs, wohingegen auch in dieser Studie keine RSNOs nachgewiesen wurden (Bastide *et al.*, 2015). Die Ergebnisse aus Humanstudien bestätigen eine Korrelation zwischen dem Verzehr von rotem Fleisch, welches reich an Häm-Eisen ist, und einem Anstieg fäkaler ATNCs (Bingham *et al.*, 2002; Cross *et al.*, 2003). Die Entstehung endogener NOCs ist dabei ausschließlich auf das Häm-Eisen im roten Fleisch und nicht auf anorganisches Eisen oder Fleischproteine zurückzuführen, was in einer Humanstudie bestätigt wurde (Cross *et al.*, 2003). Probanden wiesen nach einer Diät mit rotem Fleisch mehr fäkale ATNCs auf als die Kontrollgruppe, die sich vegetarisch ernährten (Joosen *et al.*, 2009).

Bei niedrigem pH werden im Magen RSNOs schnell aus Nitrit und Thiolgruppen gebildet und können Vorstufen von dem im Dün- oder Dickdarm-gebildeten Nitrosyl-Häm oder anderen Nitrosoverbindungen sein (Kuhnle *et al.*, 2007). Beim Eintritt der RSNOs in das alkalische Milieu des Dünndarms zerfallen diese. Die resultierende Nitrosogruppe kann z.B. Glycin bzw. Glycinderivate nitrosylieren und letztendlich in der Bildung mutagener Verbindungen wie O<sup>6</sup>-CMG und O<sup>6</sup>-MeG resultieren (Steinberg, 2019).

Weiterhin kann das intestinale Mikrobiom, aufgrund seiner nitratreduzierenden Eigenschaften, einen erheblichen Einfluss auf die Bildung fäkaler NOCs haben. So könnte Häm-Eisen, neben der direkten katalytischen Aktivität auf die endogene Bildung der NOCs, die Anzahl nitratreduzierender Bakterien erhöhen. Hinweise darauf lieferte eine Studie, in der eine erhöhte Anzahl Nitratreduktase-kodierender Gene nach einer Häm-Eisendiät beobachtet wurde (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Die am häufigsten im Gastrointestinaltrakt vorkommenden Nitratreduzierer sind den *Enterobacteriaceae* des Phylums *Proteobacteria*, aber auch den *Bacteroidaceae* und *Firmicutes* zuzuordnen (Parham *et al.*, 2000). In dieser Doktorarbeit wurde eine deutliche Zunahme sowohl innerhalb der *Proteobacteria* als auch der *Bacteroidaceae* nach Häm-Eisen in WT Mäusen beobachtet (Abb. 45). Diese könnten demnach durch ihre nitratreduzierenden Eigenschaften zusätzlich die endogene Bildung fäkaler NOCs nach Häm-Eisen beeinflussen (siehe 5.7).

Bakterielle Reduktasen reduzieren bereits im Speichel ca. 20 % des Nitrats aus der Nahrung zu Nitrit, wodurch im Magen die N-Nitrosierung von freiem Nitrit in einer säurekatalysierten Reaktion erfolgt (Holtrop *et al.*, 2012; Schmid, 2006). Die im Magen gebildeten NOCs sind Nitrosamine, die wahrscheinlich aus der Nitrosierung von sekundären Aminen mit Nitrosothiolen stammen. Diese können dann im unteren Darm als NO-Donoren fungieren (Kuhnle *et al.*, 2007). Nur etwa 30 % des diätischen Nitrats kommt im unteren Teil des Darms an (Tiso *et al.*, 2015), wo es durch den Häm-Eisen-vermittelten

Anstieg nitratreduzierender Bakterien in Nitrit umgewandelt werden könnte. Nitrit könnte weiterhin mit nicht-resorbierten Aminen zu *N*-Nitrosaminen reagieren und dadurch die fäkale Menge der NOCs erhöhen. Eine Umwandlung von Nitrat zu Nitrit durch Darmbakterien liegt nahe, da nur noch ca. 1 % Nitrat im Stuhl nachgewiesen werden kann (Tiso *et al.*, 2015).

Aufgrund der bekannten kanzerogenen Eigenschaften von NOCs, alkylierende DNA-Schäden zu induzieren, wurden in dieser Doktorarbeit neben den fäkalen NOCs auch  $O^6$ -MeG-Läsionen im Kolonepithel untersucht. Dazu wurde genomische DNA aus dem Kolon beider Genotypen nach den Spezialdiäten (Tag 162) isoliert und die Bildung von  $O^6$ -MeG semi-quantitativ mittels Slot Blot-Technik analysiert. Mit der verwendeten Methode und der eingesetzten Konzentration an Häm-Eisen in der Diät wurden weder im Kolon wildtypischer (Abb.37) noch in dem MGMT-defekter Mäuse (Abb. 38)  $O^6$ -MeG-Läsionen gemessen. Die Sensitivität der verwendeten Slot Blot-Methode könnte nicht ausreichen, um potenzielle DNA-Läsionen nach einer Häm-Eisendiät nachzuweisen. Durch die Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen wurde die Effizienz der Methode bestätigt. Ganz aktuell wurde gezeigt, dass mit der verwendeten Slot Blot-Methode keine Unterschiede der  $O^6$ -MeG-Läsionen nach *i.p.* AOM-Injektion in Kolon-DNA aus wildtypischen und MGMT-defizienten Mäusen nachweisbar waren, allerdings aber mit der höchst-sensitiven UPLC-MS/MS (*ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) (Kraus *et al.*, 2019). Im Gegensatz zu der Arbeit von Kraus wurde in dieser vorliegenden Arbeit kein direktes Alkylierungsmittel wie AOM verwendet, sondern eine Fütterung mit physiologisch relevanten Mengen an Häm-Eisen, welches potenziell über Steigerung der endogenen NOCs zu alkylierenden DNA-Schäden führen könnte.

In ersten Vorversuchen konnten in der vorliegenden Arbeit  $O^6$ -MeG-Läsionen im Kolon MGMT-defizienter Mäuse nach 162 Tagen Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät mittels UPLC-MS/MS nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war keine Detektion dieser DNA-Läsionen im Kolon wildtypischer Mäuse möglich. Diese Analysen wurden in Kooperation mit [REDACTED] durchgeföhrt.

Es besteht eine Korrelation zwischen Ernährungsgewohnheiten, bei denen viel rotes Fleisch verzehrt wird, und einer verstärkten Bildung fäkaler ATNCs sowie einem Anstieg Häm-Eisen-induzierter  $O^6$ -MeG-Läsionen in exfolierten Kolonozyten (Lewin *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde in vorherigen *in vivo*-Studien an Nagern eine Akkumulation von  $O^6$ -MeG nach 18 Monaten Häm-Eisendiät beobachtet. Dies wurde auf die potenzielle Ineffizienz der DNA-Reparaturkapazität älter werdender Tiere zurückgeföhrt (Winter *et al.*,



2014b). Dadurch könnte eine potenziell höhere Sensitivität der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber Häm-Eisen-induzierter NOCs vermutet werden. Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit keine erhöhten O<sup>6</sup>-MeG-Level nach Häm-Eisen mittels Slot Blot-Technik quantifiziert, was am geringen Häm-Eisen-induzierten Adduktlevel und der nicht ausreichenden Sensitivität der Methode liegen könnte. Vorherige Studien verdeutlichten eine erhöhte Sensitivität der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber Alkylanzien-induzierter Kolonkanzerogenese (Fahrer *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2015). Darauf basierend sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Häm-Eisen, einem potenziell alkylierenden Agens, durch die Förderung endogener NOCs im Kolon, mithilfe MGMT-defekter Mäuse analysiert werden. Die kanzerogenen Eigenschaften von NOCs resultieren aus einer unzureichenden Reparatur alkylierter DNA-Läsionen (v.a. O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG) und können zu G→A Transitionsmutationen, z.B. in *KRAS* und *p53* führen und dadurch das KRK-Risiko erhöhen (Esteller *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2004). Daher ist der Nachweis dieser kanzerogenen NOC-induzierten DNA-Läsionen in der Ätiologie von KRK von großer Bedeutung (Kraus *et al.*, 2019).

Diätisches Häm-Eisen steigert also die Menge fäkaler NOCs, die während der Langzeitfütterung zunehmen. Die Annahme der potenziellen Häm-Eisen-vermittelten Induktion von O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen im Kolonepithel durch die Steigerung der endogenen NOCs konnte nicht bestätigt werden. Einerseits könnte die Sensitivität der verwendeten semi-quantitativen Slot Blot-Methode nicht ausreichen, um O<sup>6</sup>-MeG nachzuweisen, andererseits könnte Häm-Eisen wohl eher zur Bildung von O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen führen.

### 5.3 Häm-Eisen induziert DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert die DNA-Schadensantwort

Das Kolonepithel wurde auf die Bildung genotoxischer Schäden nach Häm-Eisendiät mithilfe des Doppelstrangbruchmarkers γH2AX immunhistologisch analysiert. Die Eignung von γH2AX als früher Marker für genotoxischen Stress im Kolon wurde in vorherigen Studien hervorgehoben (Fahrer *et al.*, 2015). Nach 21-tägiger Häm-Eisendiät wurde ein deutlicher Anstieg der γH2AX-Foci im Kolonepithel beider Genotypen, verglichen mit der Kontrolldiät, beobachtet (Abb. 25). In den MGMT-reparaturdefekten Mäusen wurde bereits basal ein leicht erhöhtes Level an γH2AX-Foci nach Eisencitrat bestimmt, welches nach Häm-Eisen in den MGMT<sup>-/-</sup> signifikant höher war als das der WT Tiere (Abb. 25). Unabhängig vom Genotyp wurden γH2AX-positive Zellen nach Häm-Eisen v.a. im unteren Drittel des Kolonepithels in der Nähe der Kolonkrypten beobachtet (Abb. 25).

In früheren Studien wiesen MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse nach Behandlung mit S<sub>N</sub>1-Alyklantien, für deren Reparatur u.a. MGMT verantwortlich ist, eine erhöhte genetische Instabilität auf

(Fahrer *et al.*, 2015). Aufgrund dessen wurden mehr  $\gamma$ H2AX-positive Zellen nach der potenziell alkylierenden Häm-Eisendiät in MGMT-defizienten Mäusen erwartet und in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. 25). Zudem wurde bereits früher eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort (DNA *damage response*, DDR) v.a. im Kolonepithel MGMT-defekter Mäuse nach AOM-Injektion beobachtet, bei der die Alkylanten-induzierte O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen mit der Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci korrelieren (Fahrer *et al.*, 2015). Aufgrund verringerter DNA-Reparaturkapazität der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse könnten Häm-Eisen-induzierte Schäden persistieren, das Mutationsrisiko erhöhen und die Bildung potenziell tumorinitiierender Zellen begünstigen (Fahrer *et al.*, 2015; Schwitalla *et al.*, 2013).

Die IHC-Analysen des Kolonepithels wurden mittels Western Blot-Technik unter der Verwendung eines  $\gamma$ H2AX-Antikörpers in Kolonproteinlysaten verifiziert. Hier wurden in WT Mäusen nach 21-tägiger Häm-Eisendiät signifikant mehr  $\gamma$ H2AX-Signale, d.h. mehr DNA-Doppelstrangbrüche, im Vergleich zur Eisencitratdiät dokumentiert (Abb. 26). Die Analyse von  $\gamma$ H2AX im Kolonepithel MGMT-defizienter Mäuse ergab einen Anstieg der Level nach Häm-Eisen, der sich womöglich aufgrund der geringen Individuenzahl als nicht-signifikant äußerte (Abb. 26). Im Gegensatz dazu konnten nach 162 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spezialdiäten in beiden Genotypen dokumentiert werden (Abb. 27). Es kann hier keine Aussage über den Vergleich der  $\gamma$ H2AX-Level zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach Häm-Eisen getroffen werden. Dazu müssten die Proteinlysate beider Genotypen auf einer gemeinsamen SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse untersucht werden.

Nach initialer AOM-Gabe wurden bereits in vorherigen Studien deutliche Unterschiede der  $\gamma$ H2AX-Level im Kolonepithel wildtypischer bzw. MGMT-defizienter Mäusen dokumentiert. Allerdings wurde in diesen Studien das bekannte S<sub>N</sub>1-Alkylanz AOM verwendet (Fahrer *et al.*, 2015).

Die Diskrepanzen zwischen den Nachweismethoden könnte durch die geringere Sensitivität der Western Blot-Methode zustande kommen. Während bei einer IHC-Färbung nur epitheliale Bereiche des Kolons differenziert beobachtet werden können, wird für die Western Blot-Analyse ein kompletter Kolonabschnitt inklusive Muskel- und Bindegewebe lysiert. Dadurch könnte eine Art Verdünnung der  $\gamma$ H2AX-Schäden in den Proteinlysaten entstehen, die die Unterschiede der Messmethoden erklären könnte. Aus diesem Grund ist eine Aussage bezüglich der Häm-Eisen-induzierten  $\gamma$ H2AX-Läsionen nach Langzeitdiät mittels Western Blot schwierig und müsste mit IHC-Analysen bestätigt werden.

Die Induktion von  $\gamma$ H2AX nach einer Häm-Eisendiät steht im Einklang mit früheren Studien, in denen  $\gamma$ H2AX-positive Zellen im Dünndarmepithel wildtypischer Mäuse bereits nach einer zweiwöchigen Diät mit deutlich höheren Häm-Eisendosen in Form von Hämoglobin

(ca. 1,5  $\mu\text{mol}$  Häm/g Diät) mittels IHC nachgewiesen wurden (Bastide *et al.*, 2015). Mit dieser Arbeit wurde erstmalig ein immunhistochemischer Nachweis von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci im Dickdarmepithel nach physiologisch relevanten Mengen Häm-Eisen (0,25  $\mu\text{mol}$  Häm/g Diät) erbracht.

Neben der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde in dieser Studie zusätzlich der Einfluss von Häm-Eisen auf das Tumorsuppressorprotein p53 mittels Western Blot-Technik analysiert. Nach 21 Tagen Häm-Eisendiät wurde eine signifikante Stabilisierung von p53 im Kolonepithel wildtypischer Mäuse im Vergleich mit Eisencitrat-gefütterten Mäusen dokumentiert. In *MGMT*<sup>-/-</sup> Mäusen äußerte sich diätisches Häm-Eisen als nicht signifikanter Anstieg von p53, der auf eine niedrigere Individuenzahl zurückzuführen sein könnten (Abb. 26).

Bei der DNA-Schadensantwort spielt p53 eine essentielle Rolle (Meek, 2009) und könnte daher auch bei der Reparatur Häm-Eisen-induzierter Schäden von Bedeutung sein. Eine Akkumulation von p53 erfolgt als Antwort auf zellulären Stress und dient anschließend als Transkriptionsfaktor für z.B. Gene der DDR. Ohne zellulären Stress ist p53 an die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 gebunden, wodurch das basale p53-Level geringgehalten wird. Nach Aktivierung der DDR wird p53 phosphoryliert, löst sich von MDM2 und akkumuliert in der Zelle (Hafner *et al.*, 2019). Der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg von p53 im Kolonepithel nach Häm-Eisen könnte ein Indiz für die Induktion von Häm-Eisen-vermittelten DNA-Schäden sein. Alle Untersuchungen bezüglich des  $\gamma\text{H2AX}$ -Anstiegs und der Stabilisierung von p53 weisen darauf hin, dass diätisches Häm-Eisen ein genotoxisches Potenzial besitzt und die DDR aktiviert.

Frühere Genexpressionsanalysen des Kolonepithels ergaben eine Häm-Eisen-vermittelte Expressionssteigerung von *Survivin*, einem anti-apoptotischen Gen, dessen Transkription durch p53 erfolgt (Ijssennagger *et al.*, 2012b). Indirekt könnte das einen Hinweis auf eine Häm-Eisen-induzierte p53-abhängige Genexpression liefern. Zudem ist das p53-kodierende Gen in 30 % aller kolorektaler Tumore mutiert (Shivapurkar *et al.*, 1997; Vogelstein *et al.*, 1988) und stellt daher eine wichtige Untersuchungsgrundlage kolorektaler Tumore dar.

Um einen systemischen Effekt einer Häm-Eisendiät in Abhängigkeit des *MGMT*-Status zu untersuchen, wurden periphere Blutzellen des adaptiven Immunsystems auf DNA-Schädigung untersucht. Dazu wurden CD3-positive T-Zellen nach 21 Tagen Spezialdiät im Blut beider Genotypen mithilfe der BDM auf die Bildung von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci analysiert. Aktivierte T-Zellen (CD3-positiv) spielen im peripheren Blut eine wichtige Rolle in der Modulation einer spezifischen Immunantwort (Murphy *et al.*, 2018), deren Schädigung von

immunologischer Bedeutung sein könnte. In früheren Studien wurde eine Dysregulation peripherer Blutzellen mit einem erhöhten systemischen Schaden in DNA-Reparaturdefekten ( $ATM^{-/-}$ ) Mäusen nach chronischer intestinaler Entzündung beobachtet (Westbrook *et al.*, 2010). Hier sollte die Beeinflussung von Häm-Eisen-induzierter Kolitis auf das periphere Blutsystem untersucht werden. Es wurden in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der DNA-Schädigung zwischen den Diäten im Blut wildtypischer Mäuse quantifiziert, wohingegen MGMT-defekte Mäuse nach Häm-Eisen signifikant mehr  $\gamma$ H2AX-Foci in CD3-positiven T-Zellen des peripheren Blutes aufzeigten (Abb. 28). Ein statistischer Vergleich der Ergebnisse zwischen MGMT-profizienten und -defizienten Mäusen ergab eine signifikant gesteigerte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci (Abb. 59 siehe Anhang). Diese Beobachtung könnte auf eine erhöhte Sensitivität der T-Zellen gegenüber einer Häm-Eisendiät bzw. einer Häm-Eisen-induzierten Kolitis (5.6) von MGMT-defekten Mäusen, aufgrund fehlender MGMT-Reparaturkapazität, hindeuten. Frühere Studien zeigten, dass MGMT sowohl in Monozyten als auch in peripheren Lymphozyten stark, jedoch in einem unterschiedlichem Ausmaß, exprimiert wird (Briegert *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2001). So lässt sich vermuten, dass T-Zellen MGMT exprimieren, diese in einem MGMT-*knockout*-Modell verringert sind und dadurch einen größeren DNA-Schaden aufweisen könnten. Die DNA-Schädigung der T-Zellen aus dem Blut von  $MGMT^{-/-}$  Mäusen könnte zudem aus einer verstärkten Häm-Eisen-induzierten intestinalen Entzündung resultieren, wie es in früheren Studien mit  $ATM^{-/-}$  Mäusen dokumentiert wurde (Westbrook *et al.*, 2010).

Vergleicht man die basalen  $\gamma$ H2AX-Foci mit Werten aus der Literatur, fällt auf, dass in der aktuellen Arbeit bereits eine sehr hohe basale DNA-Schädigung vorliegt. Nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden durchschnittlich 20  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positive T-Zelle dokumentiert (Heylmann *et al.*, 2016), wohingegen in der vorliegenden Arbeit das Kontrollniveau bereits bei ca. 20 Foci lag. Das Kontrolllevel aus der Literatur liegt bei ca. 8  $\gamma$ H2AX-Foci pro CD3-positiver T-Zelle (Heylmann *et al.*, 2016). Da hier keine komplett unbehandelte Kontrollmaus mitgeführt wurde, könnten diese Diskrepanzen einerseits durch die Eisencitratdiät oder andererseits aus unterschiedlichen Auswertemethoden resultieren. Hier wurde ein *Macro* für die Software *imagej* verwendet, welches automatisch die  $\gamma$ H2AX-Foci nach Definieren eines Schwellenwertes erkennt. Zur Überprüfung müsste sowohl das Blut unbehandelter Mäuse als auch das Blut von solchen nach 2 Gy ionisierender Bestrahlung mitgeführt werden.

Sowohl im Kolonepithel als auch in peripheren Blutzellen MGMT-defizienter Mäuse könnten nach Häm-Eisendiät  $O^6$ -MeG-Thymin-Fehlpaarungen aufgrund unzureichender

MGMT-Reparaturkapazität persistieren, die dann während der Replikation bzw. Proliferation aktivierter T-Zellen durch Proteine der MMR erkannt werden und potenziell DNA-Doppelstrangbrüche bilden (Mojas *et al.*, 2007; Quiros *et al.*, 2010). Diätisches Häm-Eisen könnte zudem durch die induzierten DNA-Doppelstrangbrüche zur Akkumulation von p53 im Kolonepithel führen, wodurch die DDR aktiviert wird.

#### 5.4 Zytotoxisches Potenzial einer Häm-Eisendiät auf Kolonepithelzellen

Neben den genotoxischen Eigenschaften von diätischem Häm-Eisen auf das Kolonepithel (Bastide *et al.*, 2015) ist die Häm-Eisen-vermittelte Bildung von zytotoxischem Fäkalwasser bekannt (Bastide *et al.*, 2015; Hebels *et al.*, 2012; Ijssennagger *et al.*, 2015; Ijssennagger *et al.*, 2012b; Pierre *et al.*, 2003; Sesink *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität des Fäkalwassers nach 21-tägiger Spezialdiät beider Genotypen auf nicht-maligne humane Kolonepithelzellen (HCEC) und humane Kolontumorzellen (HCT116) analysiert. Hier konnte eine deutliche Häm-Eisen-vermittelte Zytotoxizität v.a. auf die nicht-malignen HCEC beobachtet werden, während die Tumorzelllinie (HCT116) deutlich resistenter war. Die Inkubation der HCEC mit dem Fäkalwasser von Häm-gefütterten wildtypischen Tieren resultierte nach 24 h in einer signifikant reduzierten Zellviabilität (Abb. 23). Zusätzlich wurde erstmals die Zytotoxizität des Fäkalwassers MGMT-defekter Mäuse nach Eisencitrat und Häm-Eisen auf beide Kolonepithelzelllinien getestet. Vergleichbar mit der Zytotoxizität des Fäkalwassers wildtypischer Tiere, zeigte die Behandlung der HCEC mit dem Fäkalwasser der Häm-gefütterten MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant reduzierte Zellviabilität. Zudem wurde hier eine signifikante Reduktion der Zellviabilität der HCT116 nach Häm-Eisen beobachtet, jedoch deutlich weniger stark, verglichen mit den HCEC (Abb. 43). Ein Vergleich der beiden Genotypen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 57 siehe Anhang)

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen eine selektive Zytotoxizität von Fäkalwasser nach einer Häm-Eisendiät auf nicht-entartete, gesunde Darmepithelzellen im Vergleich zu Darmkrebszellen. Ähnliche Befunde dokumentierten frühere Studien, bei denen eine Behandlung prämaligener Zellen mit einem mutierten *APC*-Status (*APC*<sup>+/-</sup>) mit dem Fäkalwasser Häm-Eisen-gefütterter Ratten in einer geringeren Zytotoxizität, verglichen mit wildtypischen Zellen, resultierte (Baradat *et al.*, 2011; Bastide *et al.*, 2015; Surya *et al.*, 2016). Für diese unterschiedliche Zytotoxizität des Fäkalwassers nach Häm-Eisen könnte das Häm-Eisen-induzierte LPO-Produkt 4-HNE verantwortlich sein (Bastide *et al.*, 2015). Mechanistisch wird vermutet, dass in präneoplastischen Zellen die Signalwege hochreguliert sind, die bei der Glutathionkonjugation, HNE-Oxidation oder -Biotransformation und der Cysteinaufnahme beteiligt sind. *APC*-mutierte Zellen könnten

eine erhöhte Resistenz gegenüber einer HNE-Behandlung durch die verstärkte Expression von Genen der HNE-Metabolisierung sowie Nrf2 haben. Zudem werden in präneoplastischen Zellen zytoprotektive Enzyme (z.B. ALDH3A1, xCT, GSTA4) stärker exprimiert, was auf eine bessere zelluläre Abwehr gegenüber HNE direkt oder Häm-Eisen-vermittelte Fäkalwasserzytotoxizität hindeutet. Die Expression der Enzyme, die bei der HNE-Entgiftung beteiligt sind, wird durch Nrf2 reguliert (Baradat *et al.*, 2011; Surya *et al.*, 2016). Die erhöhte Empfindlichkeit der normalen Kolonepithelzellen könnte somit auf die Häm-Eisen-bedingte Bildung fäkaler LPO-Produkte v.a. HNE zurückgeführt werden (Baradat *et al.*, 2011; Surya *et al.*, 2016).

HCT116-Zellen besitzen zwar wildtypisches *APC* (Yang *et al.*, 2006), weisen aber einen heterozygoten  $\beta$ -*Catenin*-Status auf (Kaler *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit beobachtete geringe Anfälligkeit der HCT116-Zellen scheint daher unabhängig vom *APC*-Status zu sein und könnte eher auf den malignen Status der Zellen zurückzuführen sein.

Es wurde in der aktuellen Arbeit zusätzlich die Zytotoxizität von Häm-Eisen auf intestinale murine Kryptorganoide charakterisiert. Dazu wurden intestinale Krypten aus WT Mäusen isoliert, die sich *ex vivo* zu Organoiden differenzierten. Die Behandlung dieser Kryptorganoide mit aufsteigenden Dosen Häm-Eisen resultierte in einer dosisabhängigen Reduktion ihrer Viabilität. Bemerkenswert ist, dass bereits die Behandlung mit 10  $\mu$ M Häm-Eisen die Zellviabilität signifikant reduzierte (Abb. 24). Frühere Studien bestimmten den Häm-Gehalt des Fäkalwassers von Ratten nach einer Häm-Eisen-supplementierten Diät. Die verwendete Häm-Konzentration in der Diät dieser Studie entspricht der Häm-Konzentration, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (0,25  $\mu$ mol Häm/g Diät). Im Fäkalwasser Häm-gefütterter Ratten wurden durchschnittlich 36  $\mu$ M Häm bestimmt (Pierre *et al.*, 2003). Der in dieser Arbeit verwendete Dosisbereich (10-100  $\mu$ M) zur Behandlung intestinaler Kryptorganoide entspricht demnach den physiologischen Häm-Konzentrationen, die im Darmlumen nach einer Häm-Diät vorkommen.

Ergänzend dazu wurden die nicht-malignen HCEC direkt mit aufsteigenden Dosen Häm-Eisen behandelt. Hier wurde eine dosisabhängige signifikante Reduktion der Zellviabilität nach 24-stündiger Behandlung ab 100  $\mu$ M Häm-Eisen beobachtet. Übereinstimmend damit zeigten vorherige Studien eine erhöhte Zytotoxizität von Häm-Eisen direkt auf nicht-maligne Kolonepithelzellen, verglichen mit prämaligen bzw. malignen Zellen (Bastide *et al.*, 2015; Wecklein, 2016).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten intestinalen Kryptorganoide im Vergleich zu den immortalisierten Zelllinien die stärkste Sensitivität

gegenüber der Häm-Eisenbehandlung zeigten. Weiterhin könnten toxische Substanzen (z.B. CHF, HNE) im Stuhl Häm-Eisen-gefütterter Mäuse sowohl zytotoxisch auf gesundes Gewebe wirken als auch die intestinale Mucusbarriere negativ beeinflussen (siehe 5.7). Im Unterschied dazu scheint prämalignes bzw. malignes Gewebe resistenter zu sein, wodurch das Darmkrebsrisiko steigen könnte.

## 5.5 Hyperproliferation und Apoptosehemmung als kompensatorische Mechanismen der Häm-induzierten Schäden

Der Einfluss einer Häm-Eisendiät auf die Kolonproliferation wurde in dieser Studie über eine IHC-Färbung unter Verwendung von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) untersucht. PCNA ist bei der DNA-Replikation beteiligt und wird häufig als Marker der Zellproliferation innerhalb des Kolons verwendet (Kubben *et al.*, 1994).

Nach 21-tägiger Diät induziert Häm-Eisen sowohl im Kolonepithel wildtypischer als auch MGMT-defizienter Mäuse einen signifikanten Anstieg von PCNA-positiven Zellen. Hierbei wurden die positiven Signale v.a. im Bereich der Kolonkrypten beobachtet (Abb. 29). Während nach Eisencitratfütterung keine Unterschiede zwischen den Genotypen dokumentiert wurden, wiesen MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse nach Häm-Eisen, verglichen mit dem WT, signifikant mehr PCNA-positive Signale auf (Abb. 58 A siehe Anhang). Auf den Stammzellen an der Kryptenbasis liegen die höchstproliferierenden transient-amplifizierenden Zellen, die aus den Stammzellen hervorgehen (Gonzalez *et al.*, 2013; Slack, 2000), deren Proliferationsrate durch Häm-Eisen gefördert werden könnte.

Zusätzlich deuten histopathologische Untersuchungen des Kolonepithels nach Häm-Eisen in beiden Genotypen auf eine erhöhte Anzahl mitotischer Figuren an der Kryptenbasis hin (Abb. 54). Diese Mitosefiguren sind meist mit einer erhöhten proliferativen Aktivität der Kolonzellen verbunden (Erben *et al.*, 2014; Lüllmann-Rauch *et al.*, 2015). Die erhöhte Häm-Eisen-induzierte Proliferationsrate in dieser Arbeit bestätigte vorherige Befunde, bei denen sowohl in Mäusen (C57BL/J WT) als auch in Ratten mit verschiedenen Markern (Ki67, [<sup>3</sup>H]Thymidin) eine Häm-Eisen-bedingte Proliferationssteigerung beobachtet wurde. In diesen Studien erhielten die Tiere eine Häm-Eisendiät (0,2-1,3 µmol Häm-Eisen/g Diät) über einen Zeitraum von 2-4 Wochen (de Vogel *et al.*, 2008; Ijssennagger *et al.*, 2012a; Sesink *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 2014a). Zudem zeigten Expressionsanalysen eine Korrelation zwischen einer solchen Proliferationssteigerung und der negativen Regulierung des Proliferationsinhibitors *Wif1* und der Induktion von Zellzyklusgenen (Ki67, Cycline (Ijssennagger *et al.*, 2012a)). Hierbei liegt nahe, dass diese Hyperproliferation des Kolonepithels eine kompensatorische Reaktion auf die durch Häm-Eisen geschädigten bzw. abgestorbenen Kolonepithelzellen sein könnte. Dadurch werden diese Zellen durch

neu differenzierte Zellen aus den Stammzellen ersetzt (de Vogel *et al.*, 2008; Ijssennagger *et al.*, 2012a).

Die Homöostase der Kolonkrypten hängt neben der Zellproliferation auch vom zelltodbedingten Zellverlust ab. Wie bereits in Abschnitt 4.6 beschrieben, wurde in der aktuellen Arbeit die Spaltung der Effektorcaspase 3 immunhistochemisch im Kolonepithel nachgewiesen. Eine 21-tägige Häm-Eisendiät führte zu einer reduzierten Spaltung der Caspase 3 (*cleaved* Caspase 3) im Kolonepithel (Abb. 31). Die Spaltung dieser Caspase ist ein essentielles Ereignis bei der Induktion des apoptotischen Zelltods (Porter *et al.*, 1999). Mithilfe einer weiteren IHC-basierten Methode, dem TUNEL-Assay, wurde die Häm-Eisen-vermittelte Reduktion der Apoptoserate bestätigt. Hier resultierte die Fütterung mit Häm-Eisen nach 21 Tagen in einer signifikanten Reduktion TUNEL-positiver Zellen im Kolonepithel beider Genotypen gleichermaßen (Abb. 30, Abb. 62 siehe Anhang).

Im Einklang hierzu wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt, dass diätisches Häm-Eisen die intraepitheliale Apoptose hemmt, was durch eine reduzierte Caspase 3-Aktivität und die Induktion von verschiedenen Apoptosehemmern (*survivin*; *baculoviral IAP repeat containing 5*, Birc5; *immediate early response 3*, Ier3) bestätigt wurde (de Vogel *et al.*, 2008; Ijssennagger *et al.*, 2012a).

Im Gegensatz dazu wurde in 5.4 eine erhöhte Zytotoxizität auf Kolonepithelzellen *in vitro* nach einer Behandlung mit Häm-Eisen bzw. mit dem Fäkalwasser nach einer Häm-Eisendiät diskutiert. Diese konträren Befunde lassen vermuten, dass diätisches Häm-Eisen z.B. über Nekrose-vermittelte Zelltod-Mechanismen die Zellviabilität der Kolonepithelzellen beeinträchtigt. Mithilfe von Expressionsanalysen wurde in Studien von Ijssennagger und Kollegen nach Häm-Eisendiät eine Expressionssteigerung von *Ripk3* (Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3) beobachtet (Ijssennagger *et al.*, 2012a). *Ripk3* ist ein Mitglied des TNF-Rezeptor 1-Signalkomplexes und essentiell für die Nekroptose, einem programmierten Zelltodmechanismus (Kaiser *et al.*, 2013). Zudem korreliert eine Häm-Eisen-vermittelte Schädigung der Kolonoberfläche mit einer erhöhten Anzahl nekrotischer Zellen (de Vogel *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit ergaben die histopathologischen Untersuchungen der H&E-Färbungen nach Häm-Eisen keine Aufschlüsse bezüglich Apoptosen oder Nekrosen im Kolongewebe.

Durch die gesteigerte Proliferation kann die Bildung von Hyperplasien im Kolonepithel begünstigt werden und das KRK-Risiko zunehmen. Hyperplasien erscheinen oft als verlängerte Krypten aufgrund einer erhöhten Anzahl epithelialer Zellen (Erben *et al.*, 2014). Damit übereinstimmend wurde in dieser Doktorarbeit zusätzlich eine Häm-Eisen-vermittelte Verlängerung der Kolonkrypten nach 21 und 162 Tagen beobachtet (Abb. 34,



49). Zudem könnte durch die Häm-Eisen-induzierte Hemmung der Apoptoserate das Mutationsrisiko steigen. Geschädigte Zellen, die sonst über Apoptose minimiert würden, könnten sich weiter teilen und z.B. Mutationen in Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen induzieren und das potenzielle KRK-Risiko ansteigen.

## 5.6 Häm-Eisen induziert eine chronische Entzündung im Kolonepithel

Mithilfe einer nicht-invasiven Mini-Endoskopie wurden während eines 162-tägigen Fütterungsexperimentes makroskopische Veränderungen des Kolonepithels dokumentiert. Bereits nach 21 Tagen Fütterung ergaben die Untersuchungen des Kolonepithels sowie die anschließende Ermittlung der MEICS eine Häm-Eisen-vermittelte Kolitis, unabhängig vom Genotyp (Abb. 32). Eine kontinuierliche Häm-Eisendiät über 162 Tage resultierte in einem chronischen Entzündungsmuster mit erhöhten MEICS (Abb. 32). MGMT-defiziente Mäuse wiesen, verglichen mit dem WT, nach Häm-Eisen eine signifikant erhöhte Darmentzündung auf (Abb. 60 siehe Anhang). Zusätzlich ergaben histopathologische Untersuchungen, wie bereits in 5.5 erwähnt, signifikante Häm-Eisen-vermittelte Elongation der Kolonkrypten nach 21 Tagen in beiden Genotypen verglichen mit der Eisencitratkontrolle (Abb. 34). Diese Verlängerung wurde zudem nach 162 Tagen in Häm-Eisen-gefütterten MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet (Abb. 49). Die Analyse der Kryptenelongation in WT-Mäusen steht noch aus. Die in dieser Arbeit beobachteten Häm-Eisen-induzierten Verlängerungen der Kolonkrypten decken sich mit vorherigen Studien, in denen Ratten und Mäuse mit Häm-Eisen (0,5 µmol Häm-Eisen/g Diät) über einen Zeitraum von 14 Tage gefüttert wurden (de Vogel *et al.*, 2008; Ijssennagger *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Elongation der Kolonkrypten bereits nach der Hälfte der Häm-Eisenmenge (0,25 µmol Häm-Eisen/g Diät), verglichen mit den oben genannten Studien, dokumentiert. Diese Verlängerungen könnten für eine Häm-Eisen-induzierte Kolitis sprechen. Eine Kryptenverlängerung ist ein generelles Anzeichen einer Kolitis und deutet auf eine Proliferationssteigerung der Kolonozyten und damit einen Anstieg der epithelialen Zellzahl hin. Dies kann als Verdickung der Kolonwand auftreten (Erben *et al.*, 2014), was einen Parameter für die Beurteilung der MEICS darstellt und häufig nach Häm-Eisendiät beobachtet wurde.

Um diese Annahme einer Häm-Eisen-induzierten Kolitis zu verifizieren, wurden IHC-Analysen unter Verwendung des F4-80-spezifischen Antikörpers gegen murine Makrophagen durchgeführt. Die Fütterung mit Häm-Eisen für 21 Tage resultierte in beiden Genotypen in einem signifikanten Anstieg der Anzahl F4-80-pos. Makrophagen (Abb. 35). Eine Häm-Eisen-induzierte Zunahme der Makrophagen im Kolonepithel wurde zudem in

den detaillierten Analysen der intraepithelialen sowie der LP-ständigen Immunzellen bestätigt.

Vorherige *in vitro*-Studien zeigten, dass Häm-Eisen zudem bei der Differenzierung von Monozyten in Häm-recycling Makrophagen beteiligt ist und diese fördert (Haldar *et al.*, 2014). Dadurch wird freies Häm-Eisen von Makrophagen aufgenommen und das zytotoxische Potenzial von Häm-Eisen vermindert. Außerdem reduziert eine verstärkte Aufnahme von Häm-Eisen, z.B. aus geschädigten Erythrozyten über Makrophagen, dessen Verfügbarkeit, wodurch es möglichen Pathogenen nicht mehr als Wachstumsfaktor zur Verfügung steht (Alam *et al.*, 2017).

Der Häm-Eisen-bedingte Anstieg der Monozyten (Abb. 40, 43) könnte mit einer ständigen Erneuerung der Makrophagen aus Monozyten in Verbindung gebracht werden. Zudem produzieren Monozyten und Makrophagen eine Reihe von Zytokinen, darunter v.a. die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Sie sind weiterhin an der Produktion von anderen Zytokinen wie IL-10 und dem Chemokin CXCL8 (IL-8) sowie Prostaglandinen beteiligt, wodurch eine chronische Entzündung begünstigt werden könnte (Murphy *et al.*, 2018; Rink *et al.*, 2012). Bei der Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandinen ist das proinflammatorische Enzym COX-2 beteiligt und wurde in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch analysiert. Hier wurde ein signifikanter Anstieg von COX-2 im gesamten Kolonepithel Häm-Eisen-gefütterter Mäuse im Vergleich mit der Eisencitrat-Kontrolldiät beobachtet (Abb. 35). Es wird vermutet, dass die Prostaglandine dabei proinflammatorische und tumorpromovierende Effekte von COX-2 vermitteln und in einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse beteiligt sind (Terzic *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). In der Ätiologie von KRK ist besonders das Prostaglandin E<sub>2</sub> zu nennen (Markowitz *et al.*, 2009). COX-2 wird hauptsächlich von T-Lymphozyten gebildet (Iniguez *et al.*, 1999). Die tumorpromovierenden Mechanismen von COX-2 beinhalten neben einer *bcl-2*-vermittelten Apoptosehemmung auch eine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwegs, wodurch das Überleben und die Proliferation von T-Zellen gefördert werden (Terzic *et al.*, 2010). COX-2 ist ein induzierbares Gen, dessen Expression u.a. durch Wachstumsfaktoren, wie TGF, Zytokine (z.B. TNF, IL-1) und LPS induziert wird (DuBois *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1993). Im Kolonepithel von CED-Patienten und in entzündetem Gewebe von IL-10-defekten Mäusen, einem etablierten CED-Mausmodell, wurde ein deutlicher Anstieg von COX-2 beobachtet (Shattuck-Brandt *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 1998). Zudem zeigten Analysen der Kolonmukosa von Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine Expressionssteigerung von COX-2, die mit dem Tumorstadium korreliert (Sheehan *et al.*, 1999). Mithilfe eines *APC-knockout*-Mausmodells wurde die Rolle von COX-2 in der Entwicklung von intestinalen Polypen untersucht und verdeutlicht die

Bedeutung selektiver COX-2-Inhibitoren als potenzielles therapeutisches Mittel für die Prävention kolorektaler Polypen und Tumore (Oshima *et al.*, 1996). In einer kürzlich veröffentlichten Studie korrelierte der Grad einer chemisch-induzierten Kolitis in Mäusen mit einem deutlichen Anstieg der pSTAT-3- und COX-2-Level (Dörsam *et al.*, 2018).

Zur Analyse der Beteiligung von pSTAT-3 in der Häm-Eisen-vermittelten Kolonentzündung wurde das murine Kolonepithel nach 21-tägiger Spezialdiät immunhistochemisch gefärbt. Es konnte hier in MGMT-defekten Mäusen eine erhöhte Aktivierung von STAT-3 (pSTAT-3) nach Häm-Eisen beobachtet werden (Abb. 36). Bei STAT-3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren im Zytosol von Januskinasen (JAK) phosphoryliert und dadurch in den Zellkern transloziert wird. Dort steigert pSTAT-3 als Transkriptionsfaktor die Expression unterschiedlicher Gene (Murphy *et al.*, 2018). Er reguliert u.a. die Genexpression von *Cyclin D1* und dem anti-apoptotischen Gen *bcl-xL*. In kolorektalen Karzinomen ist eine Aktivierung von STAT-3 mit einem Anstieg von Cyclin D1 und bcl-xL verbunden. Cyclin D1 fördert die Zellproliferation, wohingegen bcl-xL die Apoptose hemmt. Daher spielt die Aktivierung von STAT-3 eine wichtige Rolle in der kolorektalen Tumorgense (Ma *et al.*, 2004). Die Häm-Eisen-vermittelte Aktivierung von STAT-3 könnte im Zusammenhang mit der beobachteten Proliferationssteigerung und reduzierten Apoptoserate im Kolonepithel nach Häm-Eisendiät stehen.

Eine erhöhte Aktivierung von STAT-3 wird zudem häufig in entzündeten Gewebeproben von CED-Patienten identifiziert und korreliert mit dem Grad der Entzündung. Diese Aktivierung von STAT-3 stellt ein Schlüsselereignis für die Transkription von T-Zellen dar, die durch IL-6 aktiviert werden und die IL-Produktion der T-Zellen in der LP vermitteln. Zudem verstärkt pSTAT-3 die Proliferation und das Überleben der T- und B-Zellen, was zu einer verstärkten, andauernden Entzündungsreaktion durch Modulierung der angeborenen Immunantwort führt. Phosphoryliertes STAT-3 zeigt ein onkogenes Potenzial und ist ein Risikofaktor für KHK (Mudter *et al.*, 2005; Sugimoto, 2008; Terzic *et al.*, 2010).

In früheren murinen Studien mit DSS-induzierter Kolitis bewirkte eine Häm-Eisendiät eine signifikante Expressionssteigerung von *IL-6* im Kolon, verglichen mit der Kontrolldiät. Dadurch wurde eine potenzielle negative Beeinflussung der Kolitis durch diätisches Häm-Eisen vermutet (Constante *et al.*, 2017).

Die Bedeutung von STAT-3 und IL-6 in chronischen Darmentzündungen wird in *Morbus Crohn*-Patienten deutlich. Diese weisen eine erhöhte IL-6 Produktion, sowie einen Anstieg des IL-6-Rezeptors durch kultivierte mononukleare Zellen der LP auf, bei denen eine IL-6-abhängige Expression und Kerntranslokation von STAT-3 beobachtet wurde. Die Analyse

von CD3-positiven T-Zellen der LP zeigte eine STAT-3-vermittelte Expressionssteigerung der antiapoptotischen Gene *bcl-2* und *bcl-xl*, wohingegen das proapoptotische *bax* unbeeinflusst war (Atreya *et al.*, 2000). Aktiviertes STAT-3 gibt in entzündetem Gewebe von CED-Patienten einen Hinweis auf eine erhöhte Makrophagen- und T-Lymphozytenaktivität (Musso *et al.*, 2005). Zusammen mit der beobachteten Induktion von pSTAT-3 könnten erhöhte COX-2-Level zu einer Verstärkung der Häm-Eisen-induzierten Dickdarmentzündung führen und möglicherweise das Risiko der Häm-vermittelten Darmkrebsentstehung erhöhen. Die beobachtete Apoptose-Hemmung und die Proliferationssteigerung nach Häm-Eisen, könnten durch eine Häm-Eisen-abhängige Induktion von pSTAT-3 und COX-2 verstärkt werden.

Zur Analyse des spezifischen Immunsystems nach Häm-Eisen wurden in dieser Arbeit CD3-positive T-Zellen im Kolonepithel nach 21-tägiger Spezialdiät mittels IHC untersucht. Hier wies das Kolonepithel wildtypischer Mäuse nach Häm-Eisen einen signifikanten Anstieg CD3-positiver T-Zellen auf, was auf die Infiltration dieser Immunzellen ins Kolonepithel hinweist (Abb. 37). Die erhöhte Anzahl CD3-positiver T-Zellen könnte für die Induktion und Regulation der zellulären Häm-Eisen-vermittelten Immunantwort verantwortlich sein. Abhängig von der Funktion werden T-Zellen in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Die genaue Zusammensetzung innerhalb der IEL und LPL nach diätischem Häm-Eisen wird im Folgenden genauer beschrieben.

Eine wichtige Rolle in der Regulierung der intestinalen Immunantwort spielt die Zusammensetzung der Immunzellen im GALT (*gut associated lymphoid tissue*) und deren Änderung während proinflammatorischer Prozesse. Im gesunden Darm interagieren B- und T-Zellen miteinander, um eine übermäßige Immunantwort und die damit assoziierte Kolitis zu verhindern (Wang *et al.*, 2015). Bereits eine 21-tägige Häm-Eisendiät resultierte in der aktuellen Doktorarbeit in einem signifikanten Anstieg der MEICS und einer Induktion verschiedener Entzündungsmarker (COX-2, pSTAT-3). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden die intraepithelialen und LP-ständigen Immunzellen isoliert und phänotypisiert. Die Häm-Eisendiät verstärkte die Akkumulation von B- und T-Zellen in der LP im Vergleich zur Eisencitratdiät, unabhängig vom Genotyp. Im Gegensatz dazu zeigten die Analysen dieser Immunzellen innerhalb der IEL keine eindeutigen Ergebnisse. In den IEL der WT Mäuse bedingt Häm-Eisen eine signifikante Reduktion der T-Zellen und eine nicht signifikante Abnahme der B-Zellen, während in MGMT-defekten Mäusen eine nicht signifikante Reduktion der T-Zellen und Zunahme der B-Zellen beobachtet wurden (Abb. 38, 41). Diese Unterschiede bezüglich der statistischen Signifikanz könnten aufgrund der geringen Individuenzahl und der großen Abweichungen der Einzelwerte zustande

kommen. In der aktuellen Arbeit wurde sowohl in der LP als auch intraepithelial ein Anstieg der B-Zellen dokumentiert, wodurch die Annahme einer Häm-Eisen-induzierten Kolitis unterstützt wird. Vorherige Studien mit WT Mäusen zeigten bestätigend dazu während einer Kolitis eine Akkumulation von B220<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der LPL und IEL (Wang *et al.*, 2015). Im GALT werden während einer Kolitis B-Zellen rekrutiert, um eine Immunantwort durch die Aufrechterhaltung regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>) zu kontrollieren. Dabei induzieren B-Zellen die Proliferation von T<sub>reg</sub>, die im Gegenzug die Differenzierung von B-Zellen in IgA-produzierende Plasmazellen anregen (Wang *et al.*, 2015). Bei T<sub>reg</sub> handelt es sich um CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen, die andere T-Zellreaktionen hemmen (Murphy *et al.*, 2018). IgA ist eines der wichtigsten Antigene, das über unterschiedliche Mechanismen für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase verantwortlich ist. Es verhindert durch die Bindung an Bakterien, dass diese sich ans Kolonepithel heften und neutralisiert dadurch bakterielle LPS und Viren. Intestinale DCs nehmen die IgA-Komplexe auf, woraufhin diese das antiinflammatorische Zytokin IL-10 produzieren. Daher hemmt IgA das Eindringen von Mikroorganismen, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Murphy *et al.*, 2018). B-Zellen spielen durch diese Kontrolle eine essentielle Rolle in der Unterdrückung einer Kolitis (Wang *et al.*, 2015).

Die T-Zellen des GALT stellen wichtige Komponenten der erworbenen Immunantwort dar, deren Aktivierung bzw. Differenzierung innerhalb der kolonständigen LP stattfindet. Während einer Immunantwort dienen sie der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (Sang *et al.*, 2017). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der Zusammensetzung der Immunzellen nach der Eisencitratkontrolle bilden den Zustand eines gesunden Darms ab. Hier sind die vorherrschende T-Zellpopulation in der LP CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wohingegen intraepithelial eine Dominanz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet wird (Abb. 39, 42). Diese Beobachtungen stehen im Einklang zu der allgemeinen Verteilung der T-Zellen im gesunden Darm (Murphy *et al.*, 2018). Bei der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation der LP handelt es sich meist um CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die B-Zellen nach einem Antigenkontakt dazu stimulieren, Antikörper zu produzieren, während intraepithelial überwiegend zytotoxische Effektor-T-Zellen identifiziert werden (Murphy *et al.*, 2018). Das intraepitheliale Kompartiment stellt die erste Kontaktstelle des Darms mit luminalen Toxinen bzw. Pathogenen dar. Die vorherrschenden zytotoxischen T-Zellen des IEL könnten direkt für die Entfernung eingedrungener Pathogene sorgen und dadurch eine verstärkte Immunreaktion verhindern (Murphy *et al.*, 2018).

Die 21-tägige Häm-Eisendiät resultiert hier in einem deutlichen Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in der LP als auch im IE beider Genotypen, während die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur in der

LP anstiegen. Im Unterschied dazu wurde innerhalb der IEL eine Abnahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Abb. 39, 42). Frühere murine Kolitis-Studien zeigten übereinstimmend dazu eine Akkumulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während einer DSS-induzierten Kolitis sowohl in der LP als auch intraepithelial, sowie eine Zunahme der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Sang *et al.*, 2017)). Weitere Studien mit Mäusen, bei denen NOD2, ein für die epitheliale Abwehr essentieller Sensor auf mikrobielle Pathogene, mutiert war, zeigten basal eine signifikante Reduktion der CD8α<sup>+</sup> IEL. Die Relevanz dieser Beobachtung ist insbesondere bei *Morbus Crohn* ersichtlich, da diese Erkrankung mit Funktionsverlustmutationen von NOD2 in Verbindung gebracht wird. Durch einen adoptiven Zelltransfer, d.h. einem Transfer von wildtypischen CD8<sup>+</sup> IEL in NOD2-defekte Mäuse, wird die Bedeutung der CD8 IEL in der Aufrechterhaltung der mukosalen intestinalen Homöostase verdeutlicht. Dieser Zelltransfer veränderte die Sensitivität gegenüber einer chemisch-induzierten Kolitis der Mäuse (Jiang *et al.*, 2013). Aufgrund der starken Bindung von CD8α an das TL (*thymic leukemia*)-Antigen, das in einem hohen Ausmaß konstitutiv von intestinalen Epithelzellen exprimiert wird, zeigen IEL in Anwesenheit von TL-CD8α eine reduzierte Proliferation und Zytotoxizität, jedoch eine verstärkte Cytokinproduktion. Es wird vermutet, dass dadurch T-Zellen ein Schutz geboten wird, ohne die epitheliale Zellschicht zu zerstören. Damit wird die Integrität der epithelialen Barriere aufrechterhalten (Gangadharan *et al.*, 2004). Eine Reduktion der intraepithelialen CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte in der vorliegenden Arbeit mit einer Verstärkung der intestinalen Entzündung, durch die Beeinträchtigung der epithelialen Barriere, korrelieren.

Die basal geringe Anzahl der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der LP kann bei Entzündungsreaktionen ansteigen und dann für eine schützende Immunantwort sorgen (Murphy *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Häm-Eisendiät die Anzahl der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der LP erhöht, was für deren Beteiligung in einer Verstärkung der Immunantwort spricht. Die hier beobachtete Verschiebung der IEL von überwiegend zytotoxischen CD8<sup>+</sup> in Richtung CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Häm-Eisen könnte ein Mechanismus zur frühzeitigen Erkennung eingedrungener Pathogene bzw. toxischer Substanzen sein. Bei wiederholtem Eindringen der Pathogene könnten diese selektiv erkannt und entfernt werden. Die Reduktion der CD8<sup>+</sup> IEL könnte aus deren zytotoxischem Potenzial und dem damit verbundenen Zelltod dieser Zelltypen resultieren. Eine Erkennung durch die intraepithelialen CD4<sup>+</sup> T-Zellen könnte die Häm-Eisen-induzierte Immunantwort modulieren.

Eine weitere Subpopulation der intestinalen T-Zellen, die durch diätisches Häm-Eisen beeinflusst wurden, sind die γδ T-Zellen. Nach 21-tägiger Fütterung bedingt Häm-Eisen

eine signifikante Reduktion der intraepithelialen  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $\gamma\delta$  IEL) von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen, während diese T-Zellpopulation innerhalb der LP eine Zunahme zeigte (Abb. 39, 42). Diese T-Zellsubpopulation scheint abhängig von ihrer Lokalisierung unterschiedliche Rollen einzunehmen. Sie reguliert intraepithelial die Homöostase des Darmepithels (Komano *et al.*, 1995), wohingegen die  $\gamma\delta$  T-Zellen der LP eine Kolitis verstärken können (Nanno *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der  $\gamma\delta$  IEL nach einer Häm-Eisendiät und die Ausbildung einer Kolitis unterstützt die Annahme einer protektiven Rolle dieser spezifischen T-Zellen. Diese Ergebnisse stehen zudem im Einklang mit Analysen der intestinalen Mukosa von *Morbus Crohn*-Patienten, die eine deutliche Reduktion der  $\gamma\delta$  IEL im Vergleich zu gesunden Patienten aufwiesen (Kadivar *et al.*, 2016). Übereinstimmend damit zeigten murine Studien mit einer DSS-induzierten Kolitis eine Abnahme der  $\gamma\delta$  IEL (Sang *et al.*, 2017). Diese  $\gamma\delta$  IEL sind regulatorisch bei der Bildung und Differenzierung intestinaler Epithelzellen beteiligt (Komano *et al.*, 1995). Studien mit  $\gamma\delta$ -TCR-defekten Mäusen zeigten Veränderungen der Muzinexpressions- und Glykosylierungsmuster, sowie eine veränderte Anzahl intestinaler Becherzellen. Der Verlust der  $\gamma\delta$  T-Zellen korreliert dabei mit einer deutlichen Verschlechterung einer experimentell induzierten Kolitis (Kober *et al.*, 2014). Interessanterweise wurde in dieser Doktorarbeit mithilfe histopathologischer Analysen bereits nach 21 Tagen Häm-Eisen eine reduzierte Anzahl an Becherzellen im Kolonepithel beider Genotypen beobachtet. Diese Häm-Eisen-vermittelte Variation der Becherzellen könnte in diesem Zusammenhang direkt mit der Abnahme der  $\gamma\delta$  IEL nach Häm-Eisen korrelieren.

Die relativ hohe basale Anzahl von  $\gamma\delta$  IEL im gesunden Darm dient aufgrund ihrer zytotoxischen und antimikrobiellen Eigenschaften zur Induktion epithelialer Apoptose und bewahrt damit die Homöostase des Darms (Kadivar *et al.*, 2016). Eine Beeinträchtigung dieser  $\gamma\delta$  IEL könnte die Selektivität gegenüber Infektionen erhöhen, was die Rolle in der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität und der protektiven Rolle dieser Immunzellen unterstreicht (Hu *et al.*, 2017; Kober *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die von  $\gamma\delta$  IEL produzierten antimikrobiellen Substanzen zytotoxisch gegenüber kommensalen, potenziell pathogenen Bakterienstämmen wirken können. Ein Verlust der  $\gamma\delta$  IEL korreliert daher mit einer vermehrten bakteriellen Invasion in die intestinale Mukosa (Ismail *et al.*, 2011). Häm-Eisen könnte so die intestinale Barriere durch eine Reduktion der  $\gamma\delta$  IEL und die damit verbundene Reduktion der Becherzellen beeinträchtigen und zusätzlich potenziell pathogenen Keimen den Eintritt in die Darmmukosa ermöglichen. Dadurch könnte eine Häm-Eisen-vermittelte Koloninflammation begünstigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der LPL nach Häm-Eisen einen Anstieg der  $\gamma\delta$  T-Zellen

innerhalb dieser unabhängig des MGMT-Status (Abb. 39, 42). Dieser Anstieg unterstützt zusammen mit den anderen proinflammatorischen Befunden erstmalig die Annahme einer Häm-Eisen-induzierten Kolitis. Murine Studien mit einer DSS-induzierten Kolitis zeigten bestätigend eine Zunahme der LP-ständigen  $\gamma\delta$  T-Zellen (Sang *et al.*, 2017). Nanno und Kollegen vermuten, dass die signifikant erhöhte Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen in *Colitis ulcerosa*-Patienten und in einem dem Krankheitsbild-ähnlichen Mausmodell die Kolitis durch eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verschlechtern könnte (Nanno *et al.*, 2008).

Neben der Wirkung von Häm-Eisen auf die lymphoiden Zellen wurde zusätzlich in dieser Arbeit die Beeinflussung von diätischem Häm-Eisen auf die myeloide Linie beobachtet. Nach einer 21-tägigen Diät steigt die Gesamtanzahl der intestinalen CD11b<sup>+</sup> Zellen sowohl in der LP als auch intraepithelial (Abb. 40, 43). Hier wurde erstmals eine signifikante Zunahme der LP-ständigen Monozyten und ein nicht signifikanter Anstieg der Makrophagen in MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach Häm-Eisen beobachtet. Bestätigend dazu wurde, wie bereits erläutert, mittels IHC ein signifikanter Anstieg der F4-80-positiven Makrophagen im Kolonepithel beider Genotypen nach 21 Tagen Häm-Eisen quantifiziert. Zusammen mit der erhöhten Monozytenzahl deuten diese Ergebnisse, im Gegensatz zu bisherigen Studien von Ijssennagger (Ijssennagger *et al.*, 2012a), auf eine Infiltration von Immunzellen nach diätischem Häm-Eisen hin. Ijssennagger und Kollegen untersuchten mittels Genexpressionsanalysen verschiedene Entzündungsmarker für Makrophagen und Neutrophile sowie mit IHC-Färbungen die Häm-Eisen-induzierten Unterschiede dieser Immunzellen. In dieser Studie wurde weder auf Gen- noch auf Proteinebene eine Entzündungsreaktion nach Häm-Eisendiät beobachtet (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Ijssennagger und Kollegen verwendeten für ihre Studie den gleichen Mausstamm (C57BL/6), der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, und fütterten die Mäuse über zwei Wochen mit der doppelten Häm-Konzentration (0,5  $\mu\text{mol}$  vs. 0,25  $\mu\text{mol}$  Häm/g Diät), die hier verwendet wurde. Für deren Genexpressionsanalysen wurde ein großer Teil des Kolons undifferenziert verwendet und die Sensitivität dieser Methode könnte für den Nachweis der Entzündungsmarker nicht ausreichen (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Die Bestimmung der immunologischen Zusammensetzung der IEL und LPL in der aktuellen Studie erfolgte mithilfe von Antikörperfärbungen auf Einzelzellebene, was für eine höhere Sensitivität dieser Methode spricht.

Weiterhin wurde in dieser Doktorarbeit ein eindeutiger Anstieg der intraepithelialen Monozyten (Abb. 40, 43) beobachtet. Diese werden bei Entzündungsreaktionen aus dem Blut rekrutiert und differenzieren sich an der Entzündungsstelle zu Makrophagen (Murphy



*et al.*, 2018). Ein vergleichbarer Anstieg der myeloiden Zellen im IE sowie die Infiltration von Makrophagen in die LP wurde in vorherigen Studien nach einer DSS-induzierten Kolitis in Mäusen beobachtet (Sang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Diese übereinstimmenden Beobachtungen zwischen den hier analysierten Häm-Eisen-induzierten Ergebnissen und einer chemisch-induzierten Kolitis deuten darauf hin, dass diätisches Häm-Eisen eine Kolitis induziert, die einer DSS-induzierten Kolitis ähnlich ist. Ein Anstieg der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der LP wurde zusammen mit einer verstärkten Infiltration von Monozyten und (neutrophilen) Granulozyten in *Colitis ulcerosa*-ähnlicher Kolitis in Mäusen beobachtet, was zudem mit der Sekretion von Entzündungsmediatoren verbunden ist (Nanno *et al.*, 2008). Übereinstimmend damit könnten der Anstieg der LP  $\gamma\delta$  T-Zellen und die zusätzliche Infiltration von Monozyten und Granulozyten (Abb. 39, 40, 42, 43) in die LP die Häm-induzierte Kolitis verschlechtern.

Neben der bereits beschriebenen antiinflammatorischen Rolle von vaskulärem Häm (Wagener *et al.*, 2001), wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine entzündungsfördernde Eigenschaft von diätischem Häm-Eisen auf das Darmepithel *in vivo* beobachtet. Durch die Phänotypisierung der intestinalen Immunzellpopulationen nach Häm-Eisen wurden keine bedeutenden Unterschiede zwischen wildtypischen und MGMT-defekten Mäusen beobachtet (Abb. 48, 49 siehe Anhang).

Eine Zusammenfassung der Häm-Eisen-induzierten Veränderungen der intestinalen Immunzellpopulationen innerhalb des IEs und der LP sind mit deren Bedeutung in Bezug auf eine Kolitis in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27: Häm-Eisen-bedingte Änderung der Immunzellpopulationen im Kolon und deren Bedeutung.** Zunahme der Immunzellen durch Häm-Eisen im Vergleich zur Eisencitratkontrolle sind mit ↑ und Abnahme mit ↓ gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede sind zudem mit einem \* und bis dato noch nicht untersuchte Zusammenhänge mit einem ? markiert. Basiert auf den Ergebnissen der IEL- und LPL-Analysen.

Intraepithelium (IE)				
	WT	MGMT <sup>-/-</sup>	Bedeutung	Referenz
<b>T-Zellen</b>	↓*	↓	Verlust der intestinalen Barrierefunktion, Verschlechterung der Kolitis	(Jiang <i>et al.</i> , 2013)
<b>CD4<sup>+</sup> T-Zellen</b>	↑*	↑	?	
<b>CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b>	↓*	↓	Beeinträchtigung der intestinalen Barriere, Verschlechterung der Kolitis	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2001; Olivares-Villagomez <i>et al.</i> , 2008)
<b>γδ T-Zellen</b>	↓*	↓*	Regulation der Homöostase des Darmepithels, erhöhte bakterielle Penetration, Verschlimmerung der Kolitis	(Hu <i>et al.</i> , 2017; Kober <i>et al.</i> , 2014)
<b>B-Zellen</b>	↑	↑	Kontrolle der Immunantwort durch Proliferation von T <sub>reg</sub> , dadurch IgA-Stimulation der B-Zellen durch T <sub>reg</sub>	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
<b>CD11b<sup>+</sup> Monozyten</b>	↑*	↑*	Rekrutierung bei Entzündungsreaktion aus dem Blut, Differenzierung zu Makrophagen	(Murphy <i>et al.</i> , 2018)
Lamina propria (LP)				
	WT	MGMT <sup>-/-</sup>	Bedeutung	Referenz
<b>T-Zellen</b>	↑*	↑	erworbene Immunantwort, Aktivierung bzw. Differenzierung in der LP; <u>während Immunantwort</u> : Aufrechterhaltung der Homöostase	(Murphy <i>et al.</i> , 2018)
<b>CD4<sup>+</sup> T-Zellen</b>	↑	↑*	?	
<b>CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b>	↑*	↑	?	
<b>γδ T-Zellen</b>	↑*	↑	Verschlechterung der Kolitis durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine	(Sang <i>et al.</i> , 2017)
<b>B-Zellen</b>	↑*	↑	?	
<b>CD11b<sup>+</sup> Monozyten</b>	↑*	↑*	Rekrutierung bei Entzündungsreaktion aus dem Blut, Differenzierung zu Makrophagen	(Murphy <i>et al.</i> , 2018)

Die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse bezüglich einer Häm-Eisen-induzierten Koloninflammation stehen im Gegensatz zu bisherigen Studien, die keinen Anstieg von Immunzellen, bzw. keine Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach zweiwöchiger Fütterung mit der doppelten Menge Häm-Eisen beobachteten (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Jedoch wurde in anderen Publikationen bereits eine Häm-Eisen-vermittelte Verstärkung einer chemisch-induzierte Kolitis durch DSS bzw. TNBS dokumentiert (Constante *et al.*, 2017; Schepens *et al.*, 2011). Zum ersten Mal wurde in dieser Doktorarbeit eine Kolitis nur durch eine 21-tägige Häm-Eisendiät mit physiologisch relevanten Dosen induziert, die zusätzlich in der Aktivierung des Immunsystems resultiert.

## 5.7 Häm-Eisen induziert eine Dysbiose des intestinalen Mikrobioms

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von diätischem Häm-Eisen auf das intestinale Mikrobiom von WT Mäusen mit Hilfe von 16S rRNA-Analysen charakterisiert. Hier wurde bereits nach 21-tägiger Häm-Eisendiät eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -Diversität, also der Artenvielfalt eines Lebensraums, im Vergleich zur Eisencitratkontrolle beobachtet. Durch die Langzeitfütterung mit Häm-Eisen wurde diese Reduktion der  $\alpha$ -Diversität stärker ausgeprägt (Abb. 44). Diese Häm-Eisen-induzierte Reduktion der  $\alpha$ -Diversität wurde in Übereinstimmung mit einer aktuellen Studie mit deutlich höheren Häm-Eisenkonzentrationen (0,9  $\mu\text{mol/g}$ ) nach vierwöchiger Diät beobachtet (Constante *et al.*, 2017). Eine solche Reduktion der  $\alpha$ -Diversität konnte auch bei Patienten festgestellt werden, die an *Morbus Crohn* oder KRK erkrankt sind (Mancabelli *et al.*, 2017). Die vorliegende Studie zeigte zudem nach Häm-Eisen, sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitfütterung, eine deutliche Reduktion der  $\beta$ -Diversität, was mit einer größeren Divergenz der Taxa innerhalb der einzelnen Proben nach den unterschiedlichen Diäten einhergeht (Abb. 44).

Das intestinale Mikrobiom setzt sich überwiegend aus den beiden Stämmen *Bacteroidetes* und *Firmicutes* zusammen. Unabhängig von der Diät waren diese Stämme in einem hohen Ausmaß vertreten (Abb. 45). Diätisches Häm-Eisen resultierte hier nach 21 Tagen Diät in einer deutlichen Verschiebung der Bakterienphyla in Richtung gramnegativer Stämme (Abb. 45). In einer vorherigen Studie wurde übereinstimmend dazu bereits nach 14-tägiger Häm-Eisendiät mit der doppelten Menge der hier verwendeten Häm-Eisenkonzentration ein Anstieg der gramnegativen Bakterien beobachtet (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, übereinstimmend mit früheren Studien, auf Phylumebene einen Anstieg der Gesamtanzahl der Taxa, die den gramnegativen *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* angehören, wohingegen die grampositiven *Firmicutes* nach Häm-Eisen abnahmen (Abb. 45 (Constante *et al.*, 2017; Ijssennagger *et al.*, 2015; Ijssennagger *et al.*, 2012a)). Diese Verschiebung der Bakterienstämme begünstigt eine intestinale Dysbiose, die mit einer Häm-Eisen-angereicherten Diät und Erkrankungen wie CED bzw. mit einer DSS-induzierten Kolitis in Mäusen in Verbindung gebracht wird (Constante *et al.*, 2017). Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie ein mehrheitlicher Anstieg des Verhältnisses von *Bacteroidetes* zu *Firmicutes* nach 21 Tagen Häm-Eisen beobachtet, das sich während der Versuchsdauer von 162 Tagen verdeutlichte (Abb. 46). Erstmals wurde mit der Langzeitfütterung in dieser Arbeit die Entwicklung des Mikrobioms nach einer Häm-Eisendiät über einen Zeitraum von 162 Tagen dokumentiert.

Interessanterweise persistiert die bereits nach 21 Tagen beobachtete intestinale Dysbiose, die sich im Laufe des Versuchs sogar stärker ausprägte (Abb. 45).

Es wird vermutet, dass die Häm-Eisen-vermittelte Zunahme der gramnegativen Bakterien durch eine selektive Zytotoxizität von Häm-Eisen gegenüber grampositiven Bakterien zustande kommt (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Das potenziell zytotoxische Häm-Eisen könnte dabei direkt die anfälligeren grampositiven Stämme durch einen antimikrobiellen Effekt des Fäkalwassers Häm-gefütterter Mäuse, der an grampositiven Bakterien getestet wurde, nachteilig beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurden gramnegative Bakterien dadurch nicht beeinträchtigt (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Die Hypothese von Ijssennagger besagt, dass das lipophile Häm-Eisen die Membran grampositiver Stämme durchdringt und intrazellulär zytotoxisch wirkt. Durch diese selektive Reduktion der grampositiven intestinalen Bakterien gegenüber der Häm-bedingten Substanzaktivität erlangen die resistenteren gramnegativen Bakterien einen Wachstumsvorteil und expandieren (Ijssennagger *et al.*, 2012a). Es wird vermutet, dass aufgrund der fehlenden LPS-beinhaltenden Membran der grampositiven Bakterien diese teilweise anfälliger gegenüber luminaler Substratkonzentrationen sind (Bovee-Oudenhoven *et al.*, 1999) und so auch auf luminale Häm-Eisenmengen reagieren könnten. Die Häm-Eisen-vermittelte Expansion gramnegativer Bakterien könnte zudem mit einer verstärkten Exposition des Kolonepithels mit LPS einhergehen (Ijssennagger *et al.*, 2012a). LPS werden von gramnegativen Bakterien produziert und sind in der Lage, eine Entzündungsreaktion über TLR (*toll like receptor*) auszulösen, da TLRs direkt LPS erkennen und z.B. Makrophagen aktivieren (Aderem *et al.*, 2000). Diese TLR-vermittelte proinflammatorische Reaktion könnte zu der hier erstmalig beobachteten Häm-Eisen-induzierten Darmentzündung beitragen.

Eisen stellt zudem einen essenziellen Mikronährstoff sowohl für den Menschen als auch dessen Mikrobiom dar. Diätisches Häm-Eisen dient v.a. Kolonbakterien, die mit spezifischen Häm-Aufnahmesystemen ausgestattet sind, als Wachstumsfaktor. Somit kann diätisches Häm-Eisen einen direkten Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung des Gastrointestinaltrakts haben. Manche Bakterien haben zur effizienten Eisenaufnahme spezielle Mechanismen entwickelt, wie z.B. die Sekretion eisenchelatierender Siderophore (Raymond *et al.*, 2003). Diese spezialisierten Siderophore werden u.a. von Vertretern der *Enterobacteriaceae*, *Actinobacteria* und *Pseudomonadaceae* abgesondert. Über die Nahrung aufgenommenes Eisen könnte direkt die Abundanz dieser eisenabhängigen Bakterientaxa durch die luminale Eisenverfügbarkeit beeinflussen. Zudem wird vermutet, dass eine reduzierte Eisenverfügbarkeit zusätzlich die Siderophorenproduktion fördert (Ellermann *et al.*, 2017). Genexpressionsanalysen von Mäusen nach einer Häm-

Eisenfütterung zeigten eine verstärkte Expression von Genen des Eisenmetabolismus. Daraus resultiert ein Wachstumsvorteil der Bakterien, die befähigt sind Häm-Eisen kontrolliert aufzunehmen und somit vor dessen Zytotoxizität zu schützen (Constante *et al.*, 2017). Taxonomische Analysen zeigten auch in der vorliegenden Arbeit, dass die Häm-Eisendiät bereits nach 21 Tagen innerhalb der *Bacteroidetes* in einem deutlichen Anstieg der *Bacteroidaceae* und *Prevotellaceae* resultierte, während die *Rikenellaceae* abnahmen (Abb. 46). Vergleichbare Ergebnisse wurden nach deutlich höheren Häm-Eisenkonzentrationen (0,9 µmol/g bzw. 0,5 µmol/g) in vorherigen murinen Studien beobachtet (Constante *et al.*, 2017; Ijssennagger *et al.*, 2012a).

Der Häm-Eisen-bedingte Anstieg einiger *Bacteroidetes*-Arten steht im Verdacht, die Pathogenese einer Kolitis z.B. über die Produktion von muzindegradierenden Sulfatasen zu verstärken. Dies bestätigend wurde eine erhöhte Aktivität bakterieller Muzinsulfatasen in *Colitis ulcerosa*-Patienten beobachtet (Tsai *et al.*, 1995). Die Existenz solcher Enzyme in *Prevotella spp.* beschreibt einen potenziellen Mechanismus der Beeinflussung von *Bacteroidetes*-Arten in CED (Ijssennagger *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2000). Durch die muzinabbauenden Sulphatasen wird die intestinale Mukusschicht geöffnet und folglich die natürliche Barrierefunktion der Epithelzellen kompromittiert (Ijssennagger *et al.*, 2015). Übereinstimmend damit korrelieren CED wie *Colitis ulcerosa* meist mit einer erhöhten Abundanz von *Bacteroides* und *Prevotella* (Lucke *et al.*, 2006). Zusätzlich zeigten omnivore Ernährungsweisen im Vergleich zu vegetarischen bzw. veganen Ernährungsweisen einen deutlichen Anstieg der *Bacteroidetes*-Arten, die zudem in kolorektalen Adenomen und Karzinomen häufig erhöht waren (Feng *et al.*, 2015; Zimmer *et al.*, 2012). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung des Häm-Eisen-vermittelten Anstiegs dieser *Bacteroidetes*-Arten und deren Relevanz für eine Kolitis und die Entstehung kolorektaler Tumore.

In dieser Doktorarbeit wurde bereits nach 21 Tagen Häm-Eisen eine signifikant reduzierte Anzahl der grampositiven *Firmicutes*, v.a. innerhalb der Taxa *Lachnospiraceae* und *Lactobacillus*, beobachtet, die über 162 Tage persistierte (Abb. 46). Vergleichbare Abnahmen wurden in Studien mit erhöhter Häm-Eisenkonzentration in Ratten nach 12 Tagen und in Mäusen (C57BL/6) nach 4-wöchiger Diät beobachtet (Constante *et al.*, 2017; Schepens *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit analysierte Häm-Eisen-induzierte Abnahme der *Clostridiaceae* und *Christensenellaceae*, die weitere Vertreter der *Firmicutes* sind (Abb. 46), deckt sich zudem mit der murinen Fütterungsstudie von Constante *et al.*, sowie mit Befunden von Patienten mit kolorektalen Adenomen (Constante *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2016). Innerhalb der *Firmicutes* wurde eine weitere Familie, die *Ruminococcaceae* klassifiziert, deren Abundanz sich durch diätisches Häm-Eisen nach

21 Tagen verringerte und während des gesamten Experiments über 162 Tage bestehen blieb (Abb. 46). Analysen von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen zeigten ebenfalls eine reduzierte Anzahl der *Ruminococcaceae*-Arten (Feng *et al.*, 2015). Die mengenmäßig geringste Abnahme verursachte diätisches Häm-Eisen in der vorliegenden Arbeit innerhalb der grampositiven *Actinobacteria*, v.a. in den *Bifidobacteriaceae* mit der größten Differenz zu der Eisencitratkontrolle nach 162 Tagen (Abb. 34). Dadurch wurden die Ergebnisse bestätigt, die nach zweiwöchiger Häm-Eisendiät mit der doppelten Menge Häm-Eisen eine vergleichbare Reduktion dieses probiotischen Bakterienstamms zeigten (Ijssennagger *et al.*, 2012a).

Neben den gramnegativen *Bacteroidetes* korreliert diätisches Häm-Eisen mit einer erhöhten Abundanz der gramnegativen *Proteobacteria*. Innerhalb dieses Stammes wurde insbesondere ein Anstieg der *Enterobacteriaceae* bereits nach 21 Tagen beobachtet (Abb. 46). Während des gesamten Versuchsaufbaus stieg die Anzahl dieses Bakterienstamms nach Häm-Eisen weiter an und erzielte die deutlichsten Unterschiede zur Eisencitratkontrolle an Tag 162 (Abb. 46). Übereinstimmend dazu wurde die Häm-Eisen-induzierte Expansion der *Enterobacteriaceae* bereits mehrfach in unterschiedlichen Tiermodellen nach verschiedenen Häm-Eisenkonzentrationen beobachtet und stellt zudem ein Kennzeichen von CED dar (Constante *et al.*, 2017; Ijssennagger *et al.*, 2012a; Schepens *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2014a). Auch omnivore Ernährungsweisen bestätigten im Gegensatz zu vegetarischen bzw. veganen Diäten einen Anstieg der *Enterobacteriaceae* (Zimmer *et al.*, 2012). In Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen wurde eine erhöhte Abundanz von *Proteobacteria*, v.a. von *Escherichia*-Arten beobachtet (Feng *et al.*, 2015; Mancabelli *et al.*, 2017). Aufgrund der teilweise humanpathogenen Stämme innerhalb der *Escherichia*-Arten, die in der Lage sind, Colibactin (siehe 1.5.1) zu produzieren, könnten von diesen Bakterienstämmen kanzerogene Eigenschaften ausgehen. Eine gesteigerte Anzahl könnte daher mit einem erhöhten KRK-Risiko verbunden sein (Bossuet-Greif *et al.*, 2018; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010; Fais *et al.*, 2018; Nougayrede *et al.*, 2006).

Ein wichtiges bakterielles Stoffwechselprodukt, das den Kolonozyten als Energiequelle dient, ist Butyrat. Es hemmt den Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und stimuliert die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen, wodurch Butyrat antiinflammatorische Eigenschaften zeigt (Segain *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2016). Zu den Hauptvertretern der Butyratbildnern des intestinalen Mikrobioms zählen u.a. die *Rikenellacea* (*Bacteroidetes*), *Ruminococcaceae* und *Lachnospiraceae* (*Firmicutes* (Qing *et al.*, 2018; Vital *et al.*, 2017)). In der vorliegenden Studie resultierte die

Fütterung mit Häm-Eisen in einer persistierenden Reduktion dieser butyratbildenden Bakterienarten nach 162 Tagen (Abb. 46), was im Einklang mit in einer vorangegangenen Studie mit einer höheren Häm-Eisenkonzentration (0,9 µmol/g) nach vierwöchiger Diät beobachtet wurde (Constante *et al.*, 2017). Übereinstimmend mit der reduzierten Anzahl butyratbildender Bakterienarten dokumentierten Constante und Kollegen eine direkt damit verbundene Reduktion des Butyratlevels im Kolon Häm-Eisen-gefütterter Mäuse (Constante *et al.*, 2017). Die Bedeutung der butyratbildenden Bakterien wird durch Analysen des Mikrobioms von CED-Patienten deutlich. Diese zeigten eine deutliche Abnahme innerhalb der *Ruminococcaceae* und *Lachnospiraceae*, wodurch die antiinflammatorische Eigenschaft dieser Stämme verdeutlicht wird (Gevers *et al.*, 2014). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion dieser Bakterienstämme nach Häm-Eisen könnte zusätzlich intestinale Entzündungsreaktionen fördern.

Meta-Analysen des Mikrobioms von DSS-induzierten Kolitis-Mäusen ergaben übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen erhöhte Abundanzen der Taxa *Bacteroidaceae* und *Enterbacteriaceae*, wohingegen die *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* in ihrer Abundanz abnahmen (Abb. 46 (Osaka *et al.*, 2017)). Somit scheint eine Häm-Eisen-haltige Diät das Mikrobiom ähnlich zu beeinflussen wie es bei einer DSS-induzierten Kolitis der Fall ist. Die Häm-Eisen-induzierte intestinale Dysbiose in Richtung gramnegativer Bakterien wurde mit einem verschlechterten Krankheitsbild der DSS-induzierten Kolitis der Mäuse in Verbindung gebracht und fördert zudem die Bildung kolorektaler Adenome in AOM/DSS-behandelten Mäusen (Constante *et al.*, 2017). Die Beteiligung des intestinalen Mikrobioms in potenziellen Häm-Eisen-vermittelten Prozessen ist in 5.8 beschrieben.

Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse der Mikrobiomanalysen mit und ohne initiale AOM-Injektion ist zu vermuten, dass Häm-Eisen hier den entscheidenden Einfluss auf das intestinale Mikrobiom hat (Abb. 64 siehe Anhang).

Zusammenfassend wurde durch Analysen des intestinalen Mikrobioms nach Langzeitfütterung mit Häm-Eisen eine deutliche Zunahme gramnegativer Bakterienstämme beobachtet, während die grampositiven in ihrer Anzahl abnahmen. Die dadurch induzierte mikrobielle Dysbiose könnte die Häm-Eisen-vermittelte intestinale Inflammation z.B. durch vermehrte LPS-Level der gramnegativen Bakterien oder durch verringerte Butyratlevel verstärken. Interessanterweise wurden Ähnlichkeiten der mikrobiellen Zusammensetzung nach Häm-Eisen beobachtet, wie es bereits bei CED bzw. kolorektalen Tumoren dokumentiert wurde. Die durch Häm-Eisen induzierte Veränderung

des Mikrobioms könnte an der beobachteten Koloninflammation beteiligt sein und durch tumorpromovierende Prozesse die Entstehung von KRK begünstigen.

### 5.8 Häm-Eisen zeigt tumorinitiierende und -promovierende Eigenschaften

In dieser Arbeit wurden die tumorinitiierenden und -promovierenden Effekte von diätischem Häm-Eisen auf KRK mithilfe von murinen Langzeitfütterungsstudien untersucht. Zur Analyse der initiierenden Eigenschaften auf Darmkrebs erhielten WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse eine mit Häm-Eisen- oder Eisencitrat-angereicherte Diät über einen Zeitraum von 162 Tagen. Hier zeigten MGMT-defiziente Mäuse eine Zunahme kolorektaler Tumore nach Häm-Eisen, während wildtypische Tiere keine Tumore entwickelten (Abb. 48). Dadurch wird eine schützende Funktion von MGMT gegenüber einer Häm-Eisendiät vermutet. MGMT repariert in einem Ein-Schritt-Mechanismus O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen und steht im Verdacht, zudem O<sup>6</sup>-CMG-Addukte zu reparieren (Senthong *et al.*, 2013). O<sup>6</sup>-MeG- und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen können durch die beobachtete Häm-Eisen-vermittelte Induktion endogener NOCs entstehen (Abb. 20). Die Ergebnisse bezüglich der höheren Anfälligkeit der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber der Bildung kolorektaler Tumore nach Häm-Eisen könnte auf eine mögliche protektive Funktion von MGMT in der Häm-Eisen-vermittelten Kolonkanzerogenese hindeuten. Aufgrund der höheren Sensitivität der MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse kann spekuliert werden, dass insbesondere Häm-Eisen-induzierte NOCs und die dadurch erzeugten DNA-Alkylierungsschäden, v.a. O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG, für die kolorektale Tumorumitiation verantwortlich sind. Die Häm-Eisen-induzierten endogenen NOCs könnten aufgrund der fehlenden Reparaturkapazität der MGMT-defekten Mäuse ausreichen, um initiierende DNA-Läsionen zu generieren.

Die Häm-Eisen-vermittelte Induktion von NOCs wurde in vorherigen Studien nach einer 18-monatigen Fütterung mit der erhöhten Bildung der prämutagenen Läsion O<sup>6</sup>-MeG im Kolon in Verbindung gebracht (Winter *et al.*, 2014b). In dieser Langzeitstudie von Winter und Kollegen wird vermutet, dass die Bildung von O<sup>6</sup>-MeG im Kolon wildtypischer Mäuse von der mit dem Alter geringer werdenden Reparaturkapazität dieser Tiere abhängt (Winter *et al.*, 2014b). In der aktuellen Arbeit wurde ein Häm-Eisen-vermittelter Anstieg der endogenen NOCs in den Fäzes dokumentiert (Abb. 20), jedoch war es aufgrund der unzureichenden Sensitivität der Nachweismethoden für O<sup>6</sup>-MeG hier nicht möglich, Häm-Eisen-induzierte DNA-Läsionen zu bestimmen. Weiterhin könnten Häm-Eisen-induzierte O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen, die in dieser Arbeit nicht bestimmt wurden, hier von größerer Bedeutung sein als die O<sup>6</sup>-MeG-Addukte. Frühere Studien legen nahe, dass Häm-Eisen bzw. rotes Fleisch sowohl die Bildung endogener NOCs als auch die damit verbundenen O<sup>6</sup>-MeG und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen fördert (Lewin *et al.*, 2006; Vanden Bussche *et al.*, 2014;



Winter *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2014b). Bleiben diese prämutagenen Läsionen unrepariert, führen diese Fehlpaarungen zu G→T Transitionsmutationen, die häufig im *KRAS*- oder *p53*-Genlocus auftreten können (Lind *et al.*, 2004). Dieses gesteigerte Mutationsrisiko im Kolon könnte als initiiertes Ereignis in der Dickdarmkrebsentstehung fungieren und das KRK-Risiko erhöhen (Esteller *et al.*, 2001b; Lind *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013).

Studien aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass MGMT als Schutzmechanismus vor NOC-induzierten DNA-Schäden dient (Fahrer *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2015) und daher das tumorinitiierende Potenzial von z.B. Häm-Eisen abschwächen könnte. Somit könnte der Funktionsverlust von MGMT einen Risikofaktor für KRK nach dem Verzehr von rotem Fleisch darstellen. Es ist bekannt, dass in der Ätiologie von sporadischen KRK die Promotorhypermethylierung von MGMT zu den wichtigsten initialen Prozesse gehört (Lind *et al.*, 2004). In dieser Doktorarbeit wurde erstmalig eine protektive Rolle von MGMT in der Häm-Eisen-vermittelten Dickdarmkrebsentstehung dokumentiert.

Die potenzielle tumorpromovierende Wirkung von Häm-Eisen wurde in WT Mäusen durch eine Langzeitdiät (162 Tage) mit Häm-Eisen nach initialer *i.p.* AOM-Injektion (15 mg/kg KG) untersucht (Abb. 51). Das kolonotrope, alkylierende AOM wird eingesetzt, um verschiedene initiale DNA-Alkylierungsschäden im Kolon zu setzen (Fahrer *et al.*, 2017), deren Promotion in der aktuellen Arbeit durch diätisches Häm-Eisen getestet wurde. Als Grundlage diente das klassische AOM/DSS-Modell der kolorektalen Karzinogenese, bei dem anstelle von DSS eine kontinuierliche Häm-Eisen-angereicherte Diät gefüttert wurde. WT Mäuse wiesen nach initialer AOM-Gabe und Langzeitfütterung mit Häm-Eisen bei einer erhöhten chronischen Koloninflammation (Abb. 50) eine erhöhte Tumorzahl sowie einen höheren Tumorscore auf, im Vergleich zu Mäusen, die mit der Eisencitratdiät gefüttert wurden (Abb. 51). Erstmals wurde durch diesen Versuchsaufbau in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt, dass Häm-Eisen nach initialer AOM-Gabe in wildtypischen Mäusen ohne genetischen Defekt kolorektale Tumore fördert.

Bereits 2003 wurden von der Forschergruppe um Fabrice Pierre die fördernden Eigenschaften von diätischem Häm-Eisen (>0,5 µmol Häm/g Diät) auf AOM-injizierte Tumorstadien, wie ACF oder MDF, nach 100-tägiger Diät in Ratten beobachtet (Pierre *et al.*, 2003). Diese wichtigen Marker der Darmkrebsentstehung sind morphologische Veränderungen der Kolonkrypten und stellen präkanzerogene Läsionen dar (Nucci *et al.*, 1997). Vorangegangene Studien zeigten, dass Häm-Eisen in der Form von Hämin eine starke Förderung AOM-induzierter ACF in Bezug auf Anzahl und Größe begünstigt (Pierre *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde die Bildung von MDF im Kolon sowohl nach einer reinen

Häm-Eisendiät als auch in Kombination mit AOM beobachtet (Bastide *et al.*, 2015; Pierre *et al.*, 2003). Diese präkanzerogenen Läsionen korrelieren meist mit einer erhöhten LPO, die zusammen mit einer gesteigerten, fäkalen Zytotoxizität bei der Darmkrebspromotion wahrscheinlich eine bedeutende Rolle spielt (Bastide *et al.*, 2015; Pierre *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wurde die Beteiligung des intestinalen Mikrobioms untersucht. Die potenziellen tumorpromovierenden Prozesse von diätischen Häm-Eisen wurden in Fütterungsstudien in Kombination mit einem Breitbandantibiotikum analysiert. Interessanterweise wurden durch die Antibiotikagabe tumorpromovierende Häm-Eisen-vermittelte Mechanismen, wie Hyperproliferation des Kolonepithels und die Bildung von TBARS, komplett aufgehoben (Ijssennagger *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015).

In dieser Arbeit wurden weitere tumorpromovierende Eigenschaften nach Häm-Eisendiät beobachtet. Die Häm-Eisen-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Marker pSTAT-3 und COX-2 kann zudem in der Initiation sowie Progression kolorektaler Tumore beteiligt sein. COX-2 steigert aufgrund seiner Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwegs und der Apoptose hemmenden Funktion die Proliferation und das Überleben v.a. von T-Zellen (Terzic *et al.*, 2010). Zusätzlich ist pSTAT-3 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für T-Zellen und an der Produktion proinflammatorischer Zytokine beteiligt. Durch diese anhaltende Entzündungsreaktion besitzen pSTAT-3 und COX-2 ein onkogenes Potenzial (Terzic *et al.*, 2010).

Die Bedeutung von PARP-1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1)-abhängigen Entzündungsprozessen in der Ätiologie der KRK wurde kürzlich in einer Studie unter Verwendung eines PARP-1<sup>-/-</sup> Mausstamm untersucht (Dörsam *et al.*, 2018). PARP-1 ist ein nukleares Enzym mit einer essentiellen Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch seine Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen (De Vos *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2017). Weiterhin ist PARP-1 in pathophysiologischen Prozessen beteiligt und fördert Entzündungsprozesse durch seine Koaktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Mangerich *et al.*, 2012). Mithilfe der PARP-1-defizienten Mäuse wurden nach AOM/DSS-Behandlung weniger intestinale Entzündungsparameter, verbunden mit einer reduzierten Anzahl kolorektaler Tumore, dokumentiert. Dadurch wurde die proinflammatorische Rolle von PARP-1 in der entzündungsinduzierten kolorektalen Kanzerogenese unterstrichen (Dörsam *et al.*, 2018). Chronische intestinale Entzündungsprozesse, wie bei CED, steigern das Dickdarmkrebsrisiko (Terzic *et al.*, 2010). So könnte auch die in dieser Doktorarbeit beobachtete chronische Kolitis nach diätischem Häm-Eisen einen potenziellen Risikofaktor für KRK darstellen.

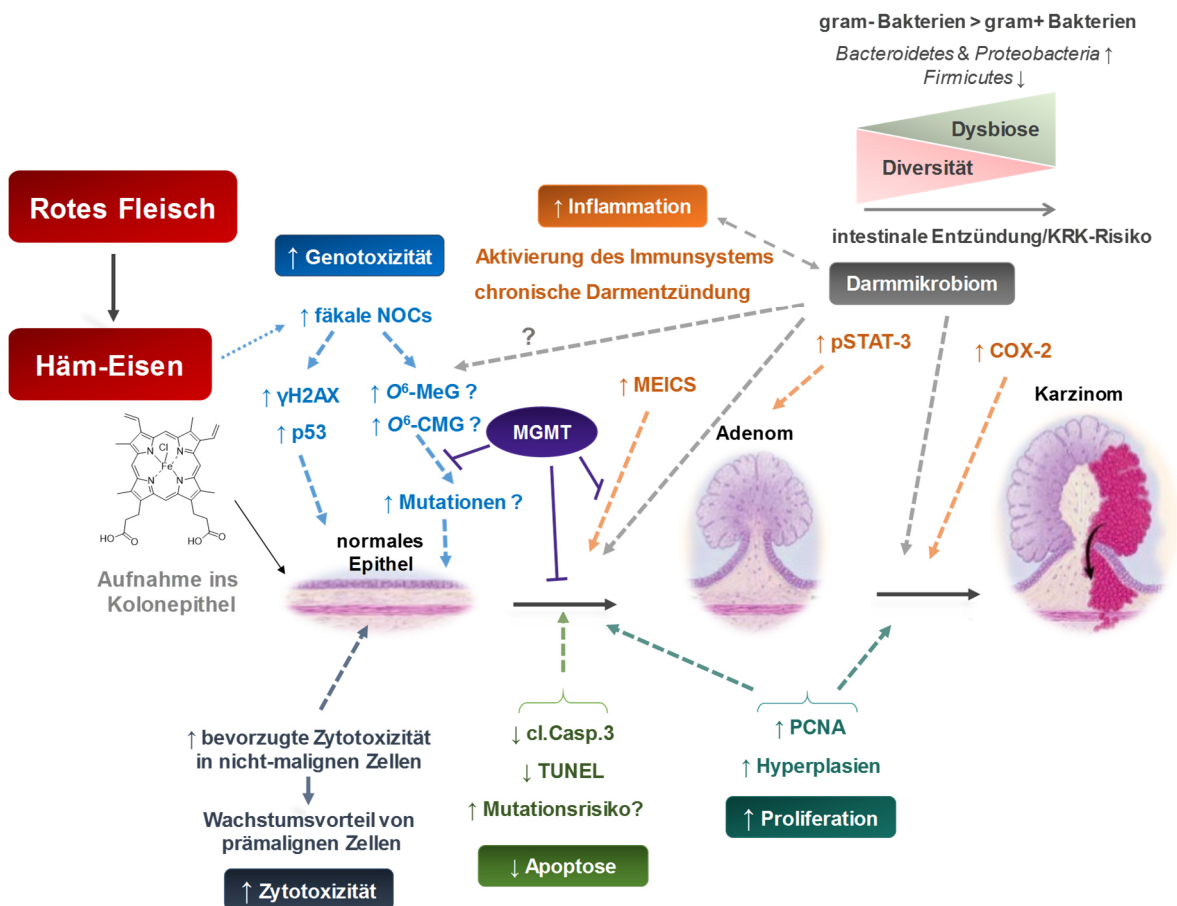
Auch die durch Häm-Eisen-vermittelte intestinale Dysbiose, sowie die chronische Kolitis sind potenzielle Faktoren, die die Bildung intestinaler Tumore nach Häm-Eisen fördern können. Neben der beobachteten Verdrängung von antiinflammatorisch wirkenden butyratbildenden Bakterien und der Expansion von gramnegativen *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotellaceae*) und *Proteobacteria*, die häufig mit KRK in Verbindung gebracht werden, könnte die Modulation des GALT von Bedeutung sein.

Die Studie von Constante und Kollegen zeigte eine Verschlechterung einer DSS-induzierten Kolitis durch diätisches Häm-Eisen, die mit einem Anstieg inflammatorischer Marker wie IL-6 und einer erhöhten Abundanz der *Enterobacteriaceae* korreliert. Zudem fördert diätisches Häm-Eisen die Bildung kolorektaler Adenome in AOM/DSS-behandelten Mäusen (Constante *et al.*, 2017).

Durch seine Beteiligung in der Expressionssteigerung von *Cyclin D1* und *bcl-xL* und der damit verbundenen Proliferationssteigerung und Apoptosehemmung besitzt pSTAT-3 ein onkogenes Potenzial. Aktiviertes STAT-3 kann sowohl in der Initiation als auch in der Progression kolorektaler Tumore beteiligt sein (Ma *et al.*, 2004). So könnte diätisches Häm-Eisen durch eine erhöhte Proliferationsrate die Bildung von Hyperplasien im Kolonepithel begünstigen. Zusammen mit der Häm-Eisen-vermittelten reduzierten Apoptose könnten diese Hyperplasien das Mutationsrisiko erhöhen und durch die Bildung Häm-Eisen-induzierter genotoxischer Schäden ( $\gamma$ H2AX,  $O^6$ -MeG,  $O^6$ -CMG) das KRK-Risiko verstärkt werden. Die verminderte Apoptoserate könnte das Überleben geschädigter Zellen begünstigen, wodurch das Mutationsrisiko weiterhin steigt und durch eine erhöhte Proliferation gefördert wird. Die selektive Zytotoxizität des Fäkalwassers nach einer Häm-Eisendiät gegenüber nicht-malignen Kolonepithelzellen könnte eine Expansion prä maligner Zellen, die sich zu malignen Zellen entwickeln, begünstigen.

Diese Doktorarbeit dokumentiert eine Beteiligung von MGMT in der Tumorinitiation nach diätischem Häm-Eisen. Weiterhin könnte der Verlust von MGMT zu einer stärkeren Häm-Eisen-induzierten Kolitis führen. Diätisches Häm-Eisen scheint neben des initiiierenden Potenzials auch promovierende Eigenschaften in Bezug auf kolorektale Tumore zu besitzen.

Abbildung 52 fasst die in dieser Arbeit ermittelten intestinalen Veränderungen nach einer Häm-Eisendiät zusammen.



**Abbildung 52: Übersicht der potenziellen tumorinitiierenden/-promovierenden Mechanismen von Häm-Eisen.**

Häm-Eisen aus rotem Fleisch gelangt über den Gastrointestinaltrakt ins Kolonepithel, in das es über die Kolonozyten aufgenommen wird. Durch die gesteigerte endogene NOC-Bildung nach Häm-Eisen könnte die Bildung alkylierter DNA-Läsionen wie O<sup>6</sup>-MeG bzw. O<sup>6</sup>-CMG begünstigt werden und bei unzureichender Reparatur z.B. durch einen Verlust der MGMT-Reparaturkapazität Transitionsmutationen begünstigen. In der Ätiologie von KRK sind solche Transitionsmutationen durch den Verlust von MGMT häufig in den Genen *KRAS* und *p53* von initialer Bedeutung. Weiterhin könnten unreparierte O<sup>6</sup>-MeG- bzw. O<sup>6</sup>-CMG-Addukte Fehlpaarungen mit Thymin eingehen, die nach Erkennung durch MMR-Proteine DNA-Doppelstrangbrüche (γH2AX) induzieren und die DDR (p53) aktivieren. Luminale Häm-Eisen übt eine selektive Zytotoxizität auf nicht-maligne gesunde Epithelzellen aus, wodurch prä maligne Zellen einen Wachstumsvorteil erlangen und persistieren können. Zusammen mit einer Häm-Eisen-vermittelten reduzierten Apoptoserate kommt es zu einer Hyperproliferation, bei der geschädigte oder mutierte Zellen überleben und die KRK-Initiation begünstigt werden kann. Eine Proliferationssteigerung kann auch bei Progression von Adenomen in Karzinome beteiligt sein. Von großer Bedeutung ist die Häm-Eisen-induzierte chronische Kolitis, die mit einer Aktivierung des intestinalen Immunsystems korreliert und sowohl in der Initiation- als auch in der Progressionsphase kolorektaler Tumore beteiligt sein kann. Damit eng verbunden ist eine intestinale Dysbiose des Darmmikrobioms nach diätischem Häm-Eisen, die mit einer Reduktion der Diversität einhergeht. Die Häm-Eisen-vermittelte Modulation des Mikrobioms könnte sowohl in der Initiation als auch in der Progression von KRK eine Rolle spielen. Zudem könnten nitratreduzierende Bakterien mit einer Steigerung endogener NOC korrelieren. MGMT könnte einen Schutz vor Häm-Eisen-induzierten O<sup>6</sup>-MeG-/O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen darstellen und somit vor der Bildung initialer Schäden schützen. Weiterhin könnte MGMT eine Häm-Eisen-induzierte Kolitis reduzieren. Die schematische Darstellung der Darmkrebsequenz wurde modifiziert nach (Markowitz *et al.*, 2009).

## 6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmalig die protektive Rolle von MGMT in einer Häm-Eisen-induzierten Kolitis sowie der Initiation kolorektaler Tumore untersucht. Weitere ergänzende Experimente zur Aufklärung zugrundeliegender molekularer Mechanismen der Häm-Eisen-vermittelten Dickdarmkrebsentstehung wären hilfreich. Dabei wäre die Charakterisierung des intestinalen Aufnahmeorts von Häm-Eisen im Vergleich zu dem von Eisencitrat anhand der Bestimmung der Eisen-Absorptionsraten in verschiedenen Dünn- und Dickdarmabschnitten mittels ICP-MS/MS interessant. In diesem Zusammenhang wäre die Bestimmung der nicht-aufgenommenen Häm-Eisenmenge sowie weiterer zytotoxischer Substanzen, wie LPO im Fäkalwasser Häm-Eisen-gefütterter Tiere sinnvoll. Aufgrund der Korrelation zwischen Häm-Eisen-induzierter LPO und der Zytotoxizitätssteigerung durch Häm-Eisen könnten HCEC oder intestinale Kryptorganoide genetisch bzw. pharmakologisch manipuliert werden, um diesen Zusammenhang mechanistisch aufzuklären. Zur Untersuchung der Häm-induzierten LPO-vermittelten Schäden in der kolorektalen Kanzerogenese könnten weitere potenziell beteiligte Reparaturenzyme wie XPA (*Xeroderma pigmentosum*) der NER untersucht werden. Hierbei wäre eine Langzeitfütterung transgener Mäuse, die einen *knockout* in XPA tragen, mit Häm-Eisen denkbar. Ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit stellte die Analyse der Häm-Eisen-induzierten Kolitis dar, die in zukünftigen Experimenten weiter mittels IHC und LPL-/IEL-Analysen charakterisiert werden sollte. Hierbei wäre interessant, zusätzlich zu der gezeigten Häm-Eisen-vermittelten Infiltration von Makrophagen, die der neutrophilen Granulozyten in die LP zu untersuchen. Diese sind neben den Monozyten/Makrophagen in der LP im Wesentlichen für die Produktion entzündungsfördernder Zytokine verantwortlich (Murphy *et al.*, 2018). Dazu müsste die Verteilung der neutrophilen Granulozyten in der LP und im IE mittels durchflusszytometrischer Analysen durch Verwendung spezifischer Antikörper untersucht werden. Weiterhin sollten diese Analysen auf die Beteiligung und die Verteilung der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ), die für die intestinale Homöostase verantwortlich sind, erweitert werden. Anhand von Genexpressionsanalysen muriner Kolongewebe sollte das Häm-Eisen-vermittelte Zytokinprofil (v.a. IL-6, IL-1, TNF $\alpha$ ) und damit die Aktivierung bzw. Inhibition beteiligter Immunzellpopulationen untersucht werden. Weiterhin könnte PARP-1, der als Co-Aktivatoren von NF- $\kappa$ B proinflammatorisch auf eine AOM/DSS-vermittelten Kolitis wirkt und bei der Progression kolorektaler Tumore beteiligt ist (Dörsam *et al.*, 2018) in der Häm-assozierten Dickdarmkrebsentstehung von Bedeutung sein. Dazu könnten PARP-1<sup>-/-</sup> Mäuse mit Häm-Eisen gefüttert und die resultierenden Entzündungsmuster sowie die KRK-Entstehung in

Langzeitstudien analysiert werden. Als Co-Aktivatoren von NF- $\kappa$ B wird PARP-1 u.a. durch NOC-induzierte DNA-Schäden aktiviert und könnte eine Häm-Eisen-induzierte Kolitis durch die Aktivierung NF- $\kappa$ B-vermittelter Entzündungsreaktionen verstärken. Der Zusammenhang zwischen einer Kolitis nach diätischem Häm-Eisen und dem daraus resultierenden KRK-Risiko könnte durch den Einsatz von COX-2-Hemmern oder durch Ausschaltung bestimmter Immunzellpopulationen über das *Cre-Lox*-System *in vivo* untersucht werden. Für die Untersuchung einer direkten Beeinflussung der Häm-Eisen-induzierten pSTAT-3-Level auf intestinale CD3-pos. T-Zellen würde sich eine IHC-Co-Färbung des Kolonepithels anbieten. Chronische Entzündungen stimulieren über Makrophagen/neutrophile Granulozyten die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies und darüber die LPO im entzündeten Gewebe. Das kanzerogene Potenzial chronischer Entzündungen wird auf die Bildung zytotoxischer und mutagener DNA-Läsionen wie Etheno-Basen ( $\epsilon$ -Basen)-Läsionen zurückgeführt. Diese werden durch das BER-Enzym AAG erkannt und repariert, wodurch das Protein vor Entzündungs-vermittelter Kolonkanzerogenese schützt (Calvo *et al.*, 2012). Der Zusammenhang zwischen Häm-Eisen-induzierter Kolitis und den Häm-Eisen-induzierten potenziellen genotoxischen LPO-Schäden wie 4-HNE-G und  $\epsilon$ -Basen-Läsionen könnten durch die Verwendung von AAG<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden. Weiterhin würde sich der Nachweis von potenziellen Häm-induzierten 4-HNE-G- sowie  $\epsilon$ -Basen-Läsionen im Kolonepithel nach Häm-Eisen anbieten. Diese könnten zusammen mit O<sup>6</sup>-MeG- und O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen in einer Dosiswirkung ( $\leq 1 \mu\text{mol Häm/g Diät}$ ) im Kolonepithel von MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen in Kooperation mit [REDACTED] [REDACTED] mittels höchst sensitiver UPLC-MS/MS-Methode analysiert werden (Kraus *et al.*, 2019). Durch einen Vergleich der O<sup>6</sup>-CMG-Gehalte im Kolon von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Tieren durch UPLC-MS/MS könnte die Rolle von MGMT in der Reparatur potenzieller Häm-induzierter O<sup>6</sup>-CMG-Läsionen untersucht werden. Der teilweise beobachtete Becherzellverlust nach diätischem Häm-Eisen sollte durch die Verwendung spezifischer Marker für Becherzellen nachgewiesen werden. Dazu könnte MUC-2, das überwiegend von intestinalen Becherzellen produziert wird (Ichikawa *et al.*, 2015; van Klinken *et al.*, 1999), direkt im Kolonepithel durch IHC, als indirekten Marker für Becherzellen, nachgewiesen werden. Zur Bestimmung des Häm-Eisen-vermittelten Zelltodmechanismus sollten IHC-Analysen mit entsprechenden Markern durchgeführt werden. Frühere Studien deuten durch die Häm-Eisen-bedingte Genexpressionssteigerung von *Ripk3* auf einen Nekroptose-vermittelten Mechanismus hin (Ijssennagger *et al.*, 2012a). *Ripk3* ist ein für die Nekroptose essentielles Protein, das die Aktivität von MLKL kontrolliert. Somit könnte der Nachweis von Nekrose im Kolonepithel nach Häm-Eisendiät durch IHC-Analysen mit *Ripk3* bzw. MLKL erfolgen.

## Anhang

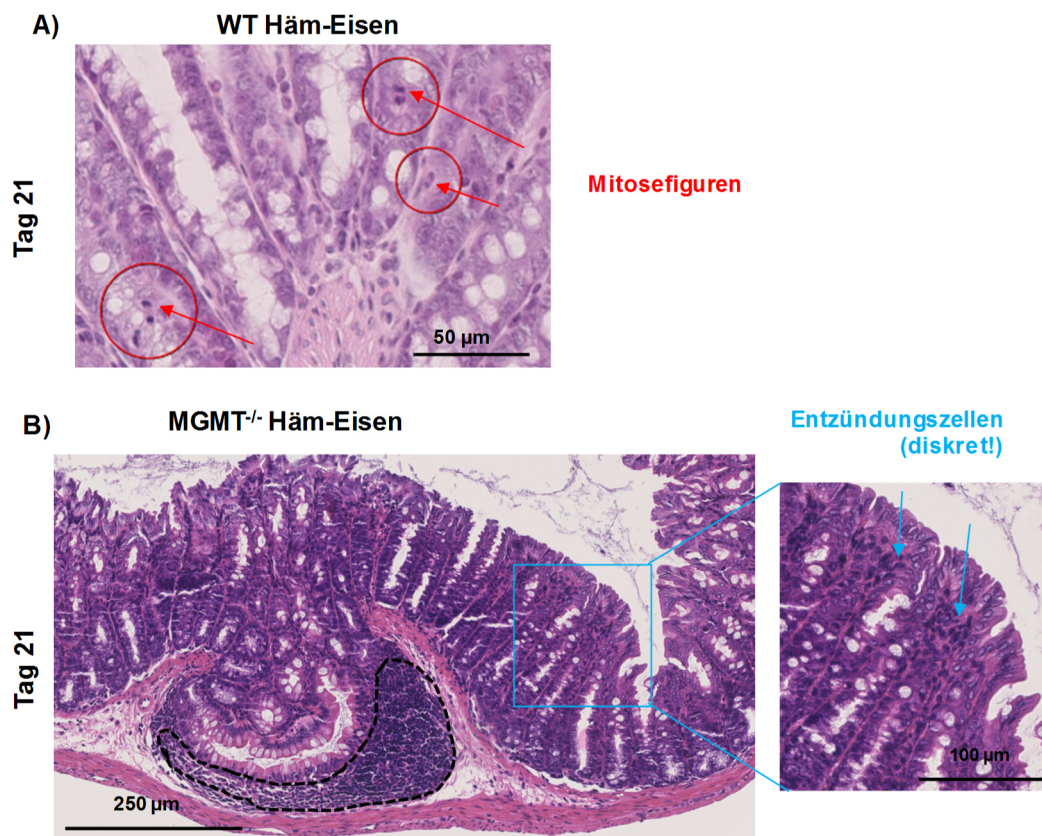
Tabelle 28: Futterzusätze der Spezialdiät von Altromin

Inhaltsstoff	Einheit	Eisencitrat-Diät	Häm-Eisen-Diät
		800 mg Calcium + 17,2 mg Eisen/kg Diät, Eisencitrat	800 mg Calcium + 0,169 g Häm/kg Diät
Rohprotein	mg/kg	174534,071	174527,716
Rohfett	mg/kg	50513,814	50512,543
Rohfaser	mg/kg	30021,443	30017,63
Rohasche	mg/kg	46762,735	46683,454
Feuchtigkeit	mg/kg	57498,42	57394,91
Disaccharide(s)	mg/kg	434360,5	435526,7
Polysaccharide(s)	mg/kg	190294,613	189163,423
Umsetzb.	kcal/kg	3669,993	3670,067
Lysin	mg/kg	17353,858	17353,669
Methionin	mg/kg	10656,381	10656,254
Cystin	mg/kg	3162,664	3162,53
Threonin	mg/kg	7094,411	7094,171
Tryptophan	mg/kg	1966,842	1966,801
Arginin	mg/kg	9751,957	9751,648
Histidin	mg/kg	5230,575	5230,394
Isoleucin	mg/kg	7161,48	7161,233
Leucin	mg/kg	14570,213	14569,439
Phenylalanin	mg/kg	7093,24	7092,923
Valin	mg/kg	3220,888	3220,585
Alanin	mg/kg	2401,526	2401,017
Asparaginsäure	mg/kg	3476,269	3475,84
Glutaminsäure	mg/kg	23374,91	23373,703
Glycin	mg/kg	3072,763	3072,509
Prolin	mg/kg	12615,637	12615,045
Serin	mg/kg	5185,592	5185,261
Tyrosin	mg/kg	9216,398	9216,122
Vitamin A	I.E./kg	15000	15000
Vitamin D3	I.E./kg	500	500
Vitamin E	mg/kg	180,4	180,4
Vitamin K3 als Menadion	mg/kg	10	10

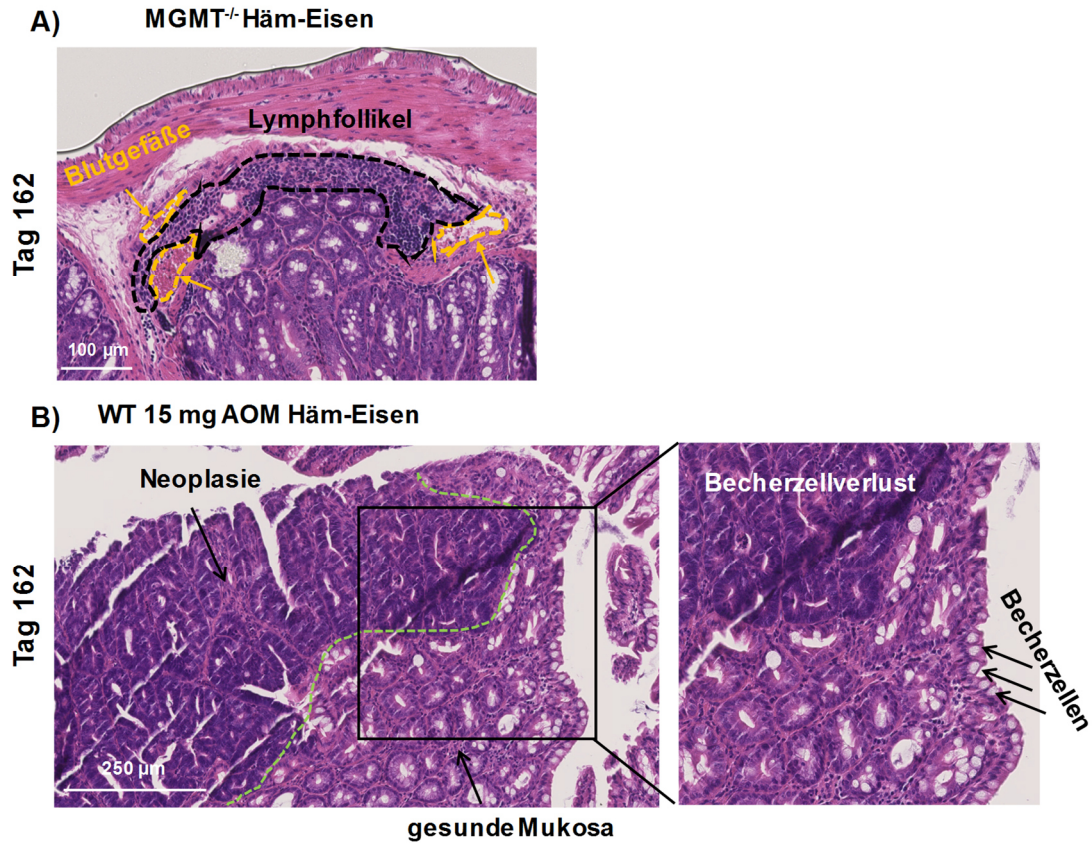
Vitamin B1	mg/kg	20,04	20,04
Vitamin B2	mg/kg	20,322	20,322
Vitamin B6	mg/kg	15,034	15,034
Vitamin B12	mg/kg	0,041	0,041
Nikotinsäure	mg/kg	50,17	50,17
Pantothensäure/Pantothenic	mg/kg	50,106	50,106
Folsäure	mg/kg	10,0024	10,0024
Biotin	mg/kg	0,201	0,201
Cholinchlorid/Choline	mg/kg	1011,5	1011,5
P-Aminobenzoessäure/Benzoic	mg/kg	100	100
Inosit	mg/kg	111	111
Vitamin C	mg/kg	20	20
Calcium	mg/kg	800,717	800,049
Ges.Phosphor	mg/kg	7612,679	7612,633
Verd.Phosphor/Digest.Phosporus	mg/kg	7591,098	7591,178
Magnesium	mg/kg	669,722	669,747
Natrium	mg/kg	2492,557	2492,459
Kalium	mg/kg	14331,328	14331,257
Schwefel	mg/kg	2699,213	2699,022
Chlor	mg/kg	3685,047	3685,003
Eisen	mg/kg	17,261	17,215
Mangan	mg/kg	96,627	96,626
Zink	mg/kg	28,462	28,461
Kupfer	mg/kg	5,408	5,408
Jod	mg/kg	0,625	0,625
Molybdän	mg/kg	0,5	0,5
Fluor	mg/kg	8	8
Selen	mg/kg	0,602	0,602
Kobalt	mg/kg	0,512	0,512
Laurinsäure C-12:0	mg/kg	50	50
Myristinsäure C-14:0	mg/kg	100	100
Palmitinsäure C-16:0	mg/kg	2500	2500
Palmitoleinsäure C-16:1	mg/kg	150	150
Margarinsäure	mg/kg	100	100
Stearinsäure C-18:0	mg/kg	1350	1350
Ölsäure C-18:1	mg/kg	13500	13500



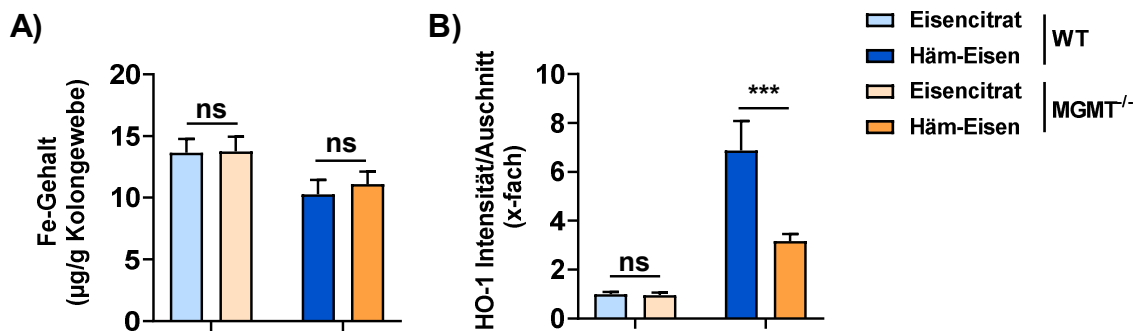
Linolsäure C-18:2	mg/kg	28500	28500
Linolensäure C-18:3	mg/kg	150	150
Arachinsäure C-20:0	mg/kg	50	50
Eicosaensäure C-20:1	mg/kg	150	150
Behensäure C-22:0	mg/kg	150	150
Erucasäure C-22:1	mg/kg	50	50
Lignocerinsäure C-24:0	mg/kg	250	250
Aluminium	mg/kg	3,102	3,099
Volumen	kg	1000	1000



**Abbildung 53: Histopathologische Untersuchung des Kolonepithels nach 21-tägiger Häm-Eisendiät.** WT und MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden mit Häm-Eisen gefüttert. Repräsentative gescannte Aufnahmen von H&E-gefärbten Kolonschnitten wildtypischer (A) und MGMT-defizienter Mäuse (B) dargestellt mit NDP.view2. A) Mitosefiguren sind mit roten Pfeilen im Kolonepithel von WT Tieren markiert. B) Blaue Pfeile zeigen diskrete Entzündungszellen und mit der gestrichelten Linie ist ein Lymphfollikel angezeigt.



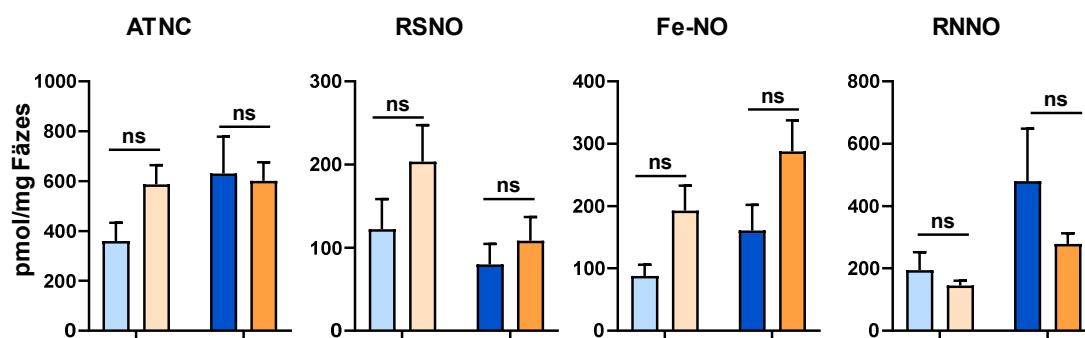
**Abbildung 54: Histopathologische Untersuchung des Kolonepithels nach 162-tägiger Häm-Eisendiät.** Repräsentative gescannte Aufnahmen der H&E-gefärbten Kolonschnitte MGMT-defekter Mäuse nach Häm-Eisendiät (A) und wildtypischer Tiere nach AOM-Injektion und diätischem Häm-Eisen MGMT-defizienter Mäuse (B) dargestellt mit NDP.view2. A) Orange-markierte Bereiche zeigen eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen. Mit der schwarzen gestrichelten Linie ist ein Lymphfollikel abgegrenzt. B) Grün-gestrichelte Linie grenzt eine Neoplasie von der gesunden Mukosa ab. Innerhalb der Neoplasie erkennbar ist ein Becherzellverlust.



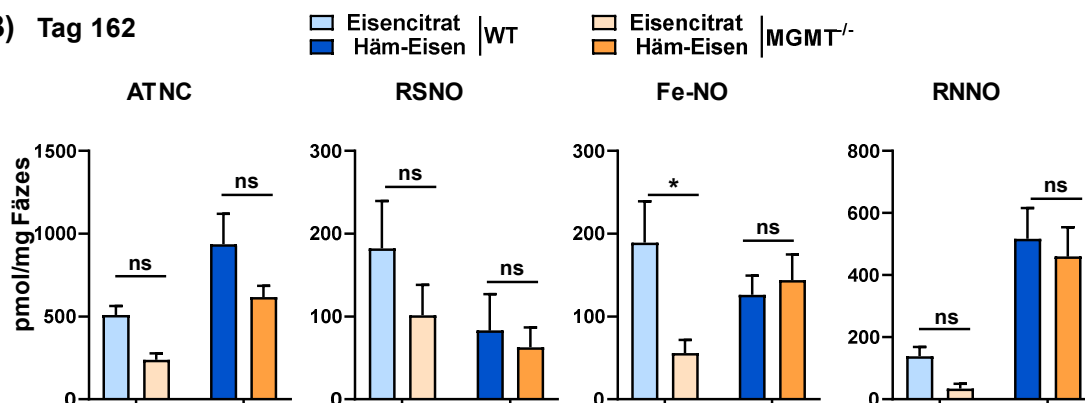
**Abbildung 55: Eisenaufnahme und HO-1 im Kolonepithel von WT und MGMT<sup>-/-</sup>.**

Statistischer Vergleich des Eisengehalts im Kolonepithel (A) sowie der HO-1 Intensität (B) zwischen den Genotypen. A) Quantitative Auswertung der Eisenaufnahme mittels ICP-MS/MS. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6) gezeigt. Der statistische Vergleich der Aufnahmeraten erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant. B) Quantifizierung der HO-1-Intensität. Aufgetragen wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n $\geq$ 5, 8-10 Aufnahmen pro Tier) und die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*\*\*p<0,001.

## A) Tag 21



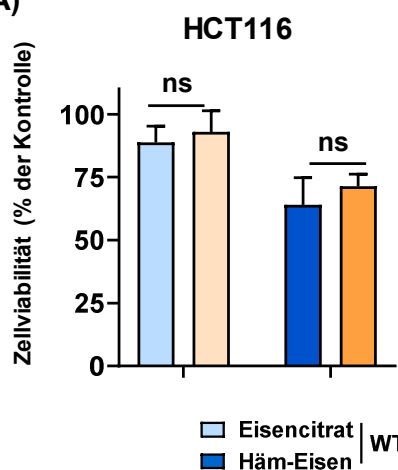
## B) Tag 162



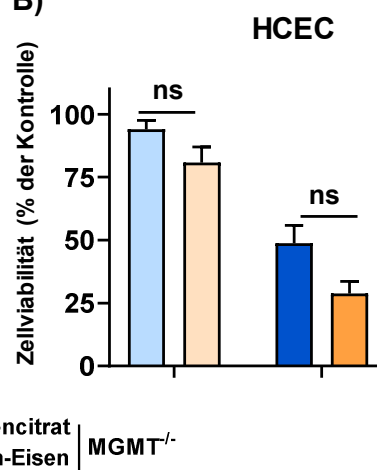
**Abbildung 56: statistischer Vergleich der fäkalen NOCs zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Die Tiere wurden mit Eisencitrat bzw. Häm-Eisen gefüttert und Stuhlproben an Tag 21 (A) und 162 (B) auf die Bildung fäkaler NOCs untersucht. Quantifizierung der NOCs, dargestellt als ATNC, RSNO, Fe-NO und RNNO. Dargestellt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$ ) und die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \* $p < 0,05$ .

## A)

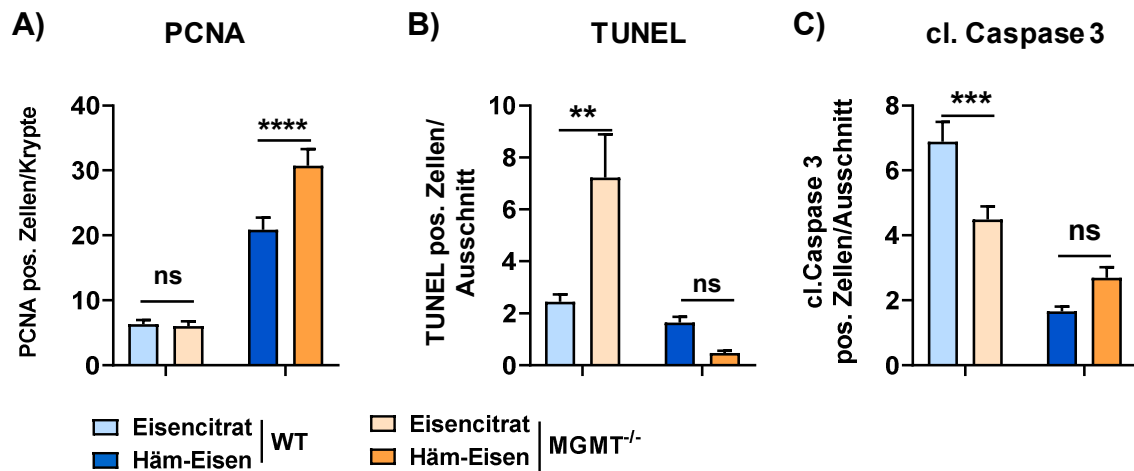


## B)



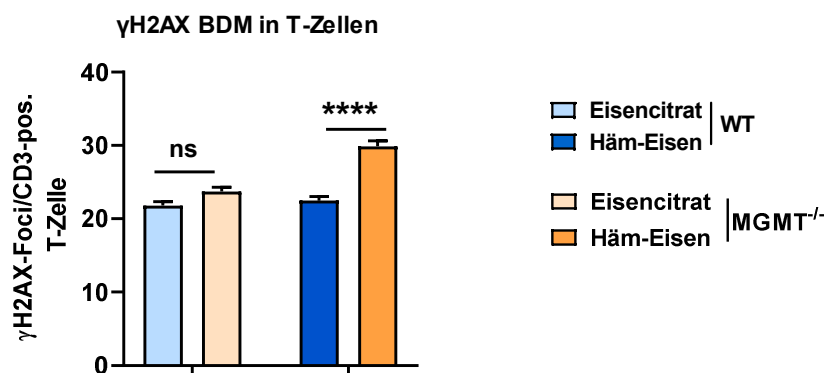
**Abbildung 57: Vergleich der Fäkalwasserzytotoxizität aus WT und MGMT<sup>-/-</sup> in Kolonepithelzellen.**

Behandlung von HCT116 (A) und HCEC (B) mit dem Fäkalwasser von WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäusen nach 21 Tagen Fütterung. Dargestellt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 11$ ). Der statistische Vergleich der Zellviabilitäten nach Behandlung mit dem Fäkalwasser von WT und MGMT<sup>-/-</sup> mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant.



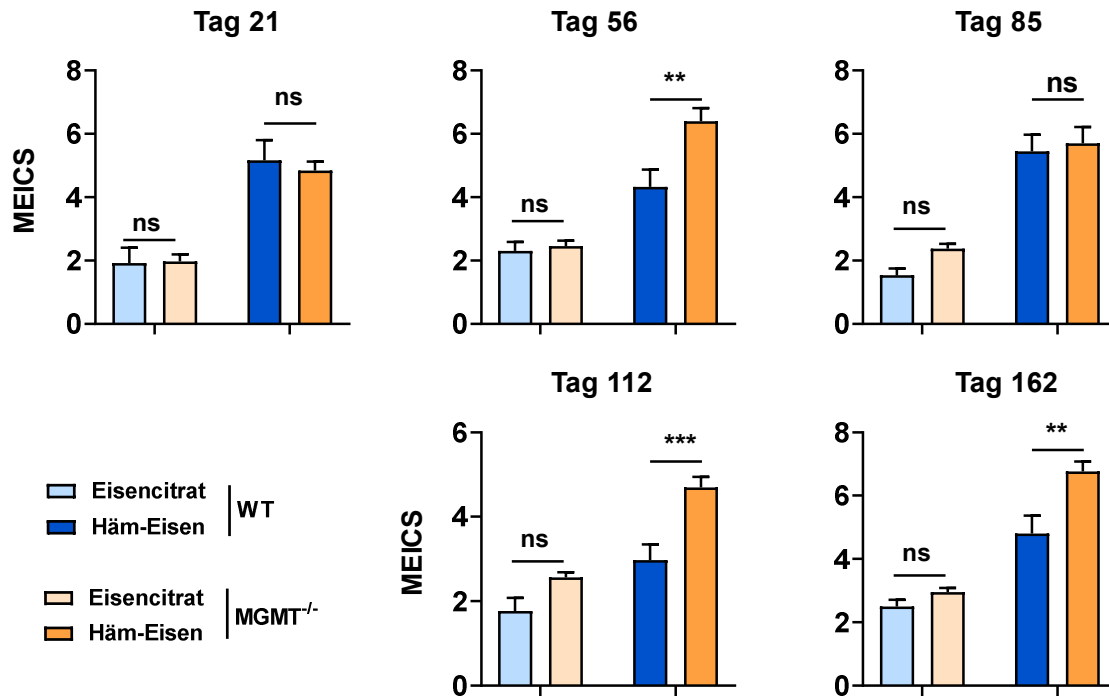
**Abbildung 58: Vergleichende Analyse zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> nach Eisencitrat und Häm-Eisen.**

Die Mäuse erhielten 21 Tage Eisencitrat oder Häm-Eisen mit anschließender IHC-Analyse von PCNA- (A), TUNEL- (B) und *cleaved* (cl.) Caspase 3- (C) positiven Zellen. Dargestellt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ , je 6-10 Ausschnitte) und der statistische Vergleich zwischen den Genotypen wurde mittels zweiseitigem ANOVA ermittelt. ns=nicht signifikant; \*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



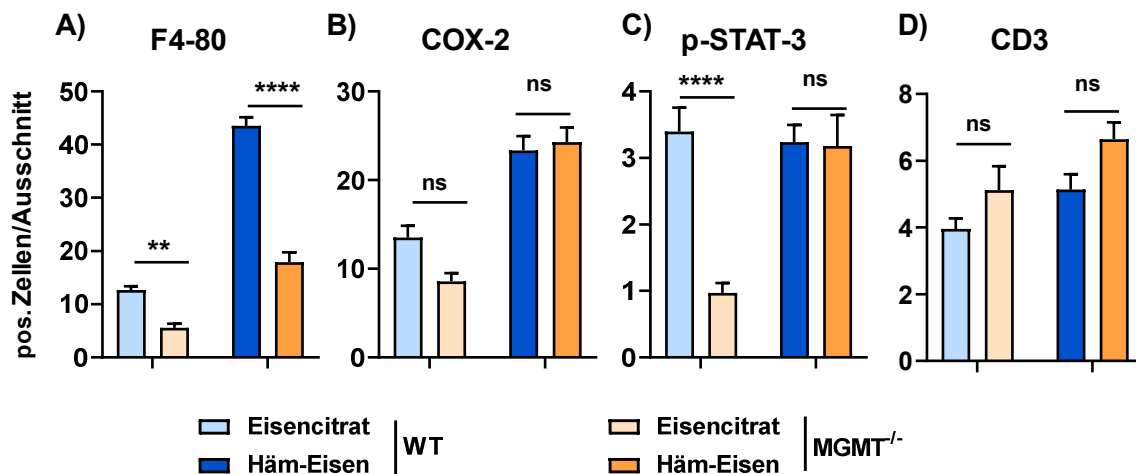
**Abbildung 59: Statistischer Vergleich der γH2AX-Foci in peripheren Blutzellen von WT und MGMT<sup>-/-</sup>.**

Die Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert und die DNA-Doppelstrangbrüche (γH2AX) mittels BDM in CD3-pos. T-Zellen des peripheren Blutes analysiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ , je 12-15 verschiedene Aufnahmen). Statistischer Vergleich zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup> erfolgte mit einem zweiseitigen ANOVA. ns=nicht signifikant; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



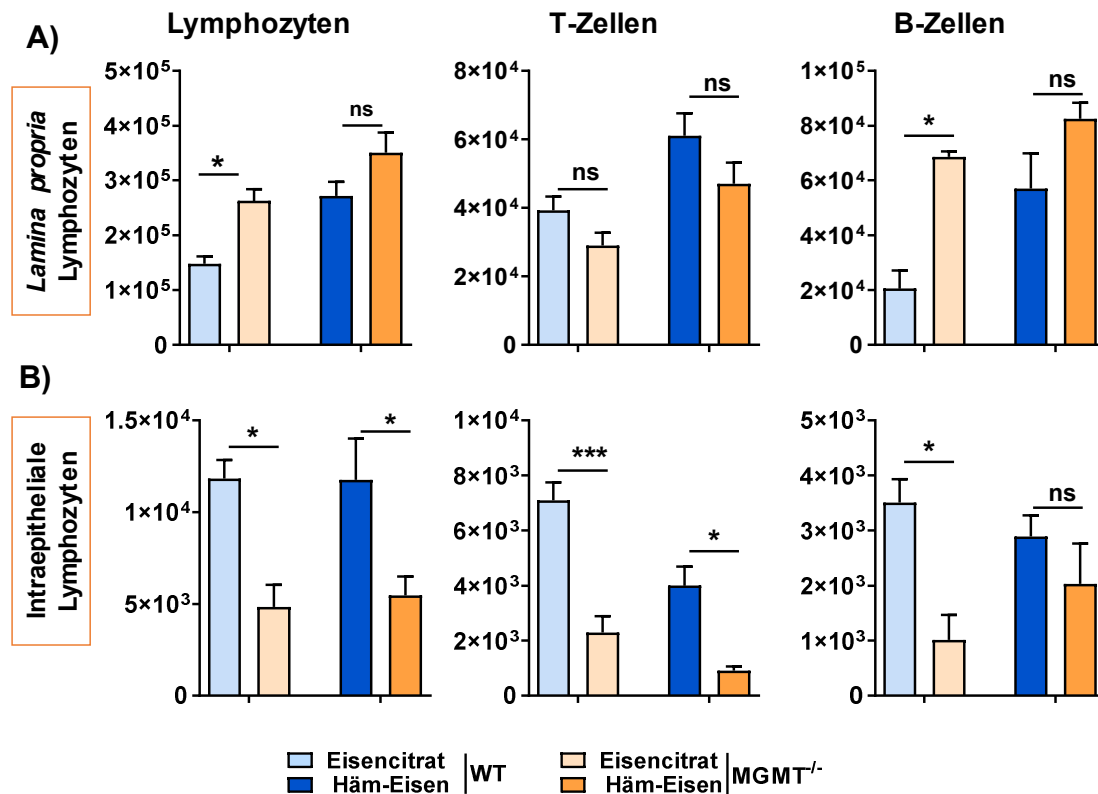
**Abbildung 60: Statistischer Vergleich des Entzündungsgrades der Kolitis zwischen den Genotypen.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden über 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die Kolonenzündung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Mini-Endoskopie an narkotisierten Mäusen untersucht. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n \geq 9$ ) dargestellt. Die statistische Auswertung des Vergleichs zwischen den Genotypen erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



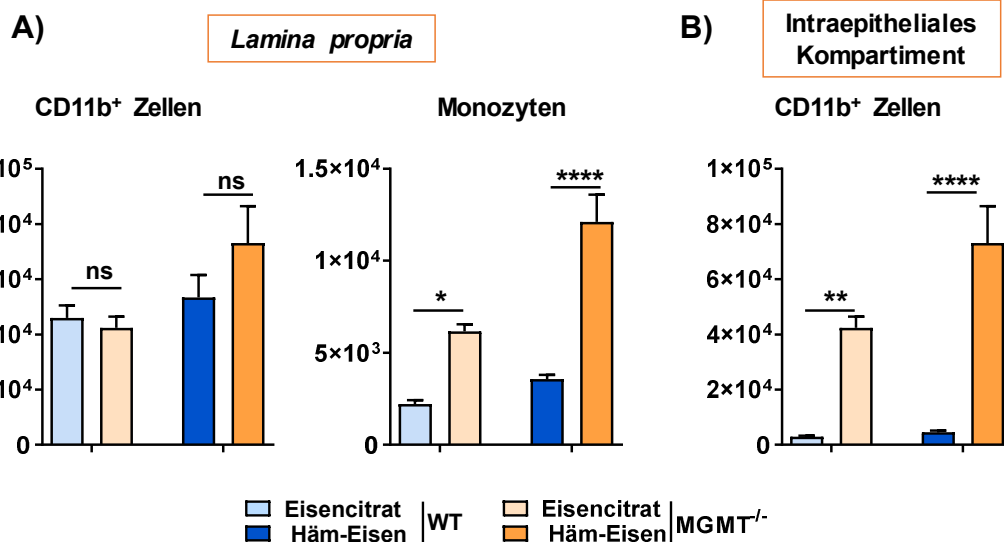
**Abbildung 61: Vergleich der mittels IHC-bestimmten Inflammationsmarker zwischen den Genotypen.**

WT und MGMT<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten für 21 Tage eine Eisencitrat- oder Häm-Eisendiät. Statistischer Vergleich der mittels IHC-bestimmten Entzündungsparameter im Kolonepithel zwischen den Genotypen. Dargestellt sind jeweils positive Zellen, der F4-80- (A), COX-2- (B), p-STAT3- (C) und CD3-IHC (D). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ , je 6-10 Ausschnitte pro Tier) dargestellt und die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



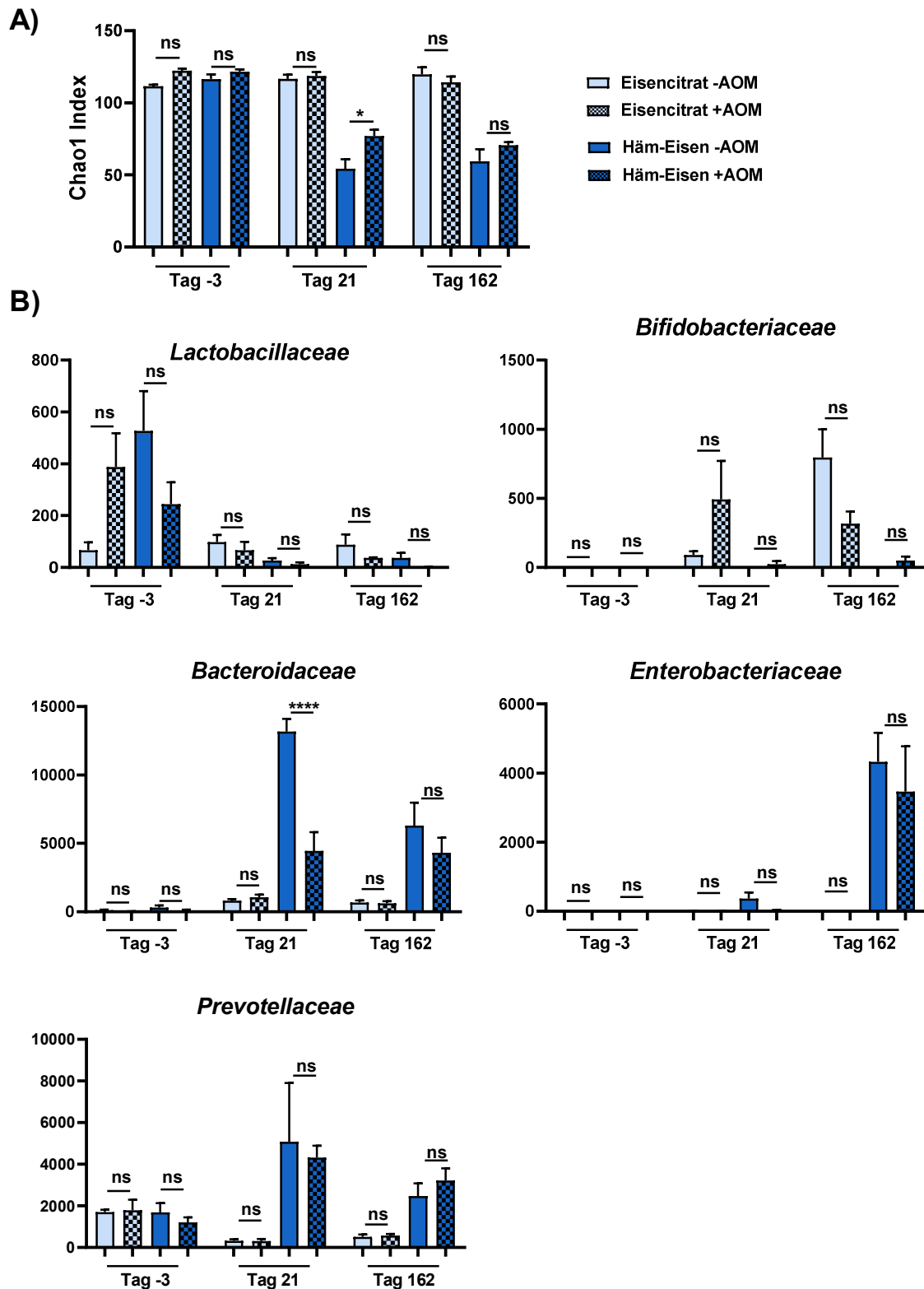
**Abbildung 62: Vergleichende Analyse intestinaler Lymphozyten zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup>.**

Die Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Anzahl intestinaler Lymphozyten, T-Zellen und B-Zellen der LPL (A) und den IEL (B). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n≥4), statistisch ausgewertet mit zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.



**Abbildung 63: Vergleichende Analyse intestinaler myeloider Immunzellen zwischen WT und MGMT<sup>-/-</sup>.**

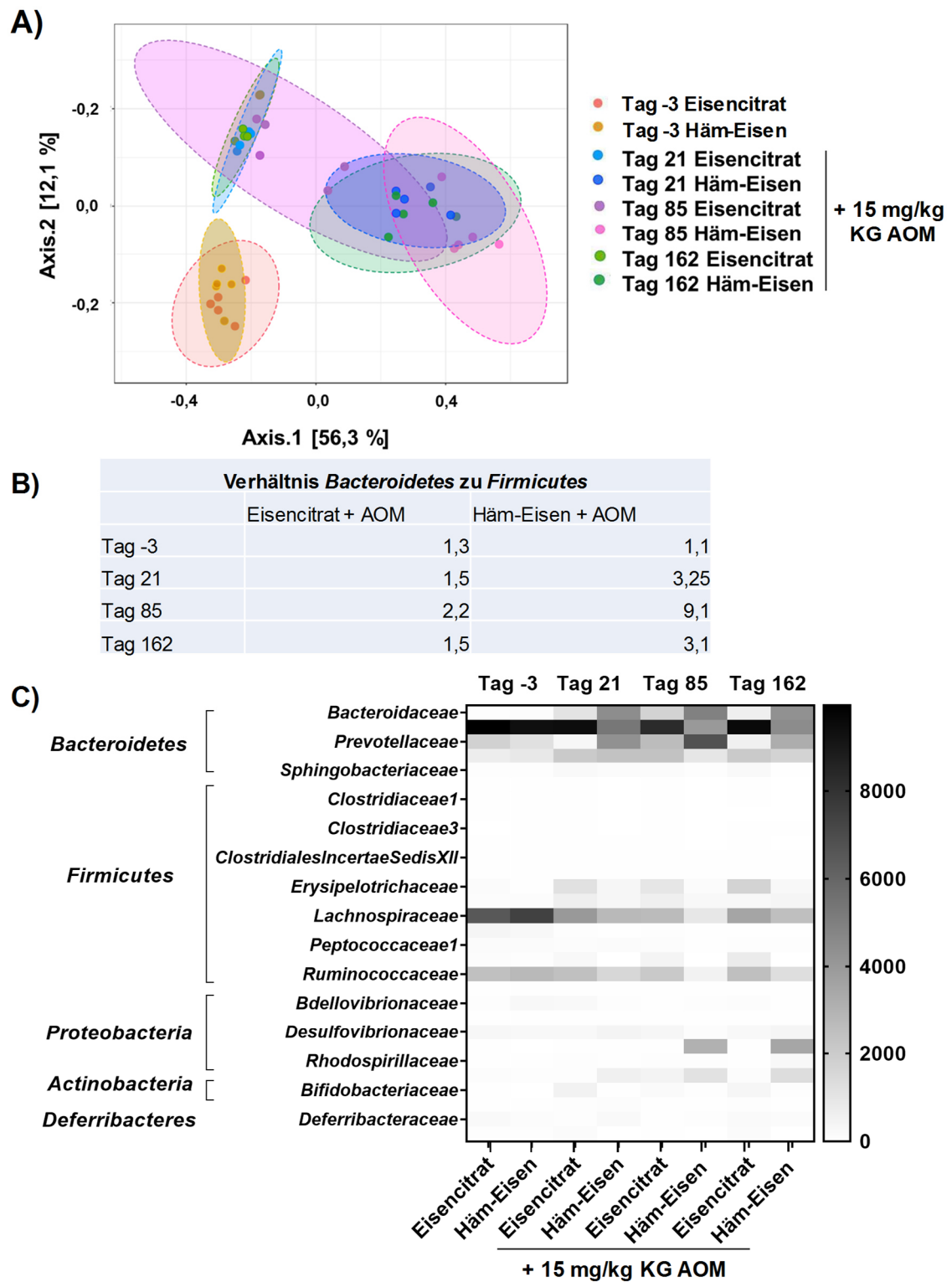
Die Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Anzahl intestinaler CD11b<sup>+</sup>-Zellen sowie die Monozytenzahl innerhalb der LP (A) und des IE (B). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n≥4), statistisch ausgewertet mit zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.



**Abbildung 64: Vergleichende Analyse der Mikrobiota von WT Mäusen mit und ohne AOM-Injektion.**

Den WT Tieren wurde vor Fütterungsbeginn 1x PBS oder AOM (15 mg/kg KG) injiziert und 162 Tage Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die bakterielle DNA wurde aus Stuhlpellets der angegebenen Zeitpunkte isoliert. A) Chao1-Index der  $\alpha$ -Diversität und B) taxonomische Analyse des intestinalen Mikrobioms. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und der statische Vergleich zwischen den Genotypen erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA. ns=nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001.

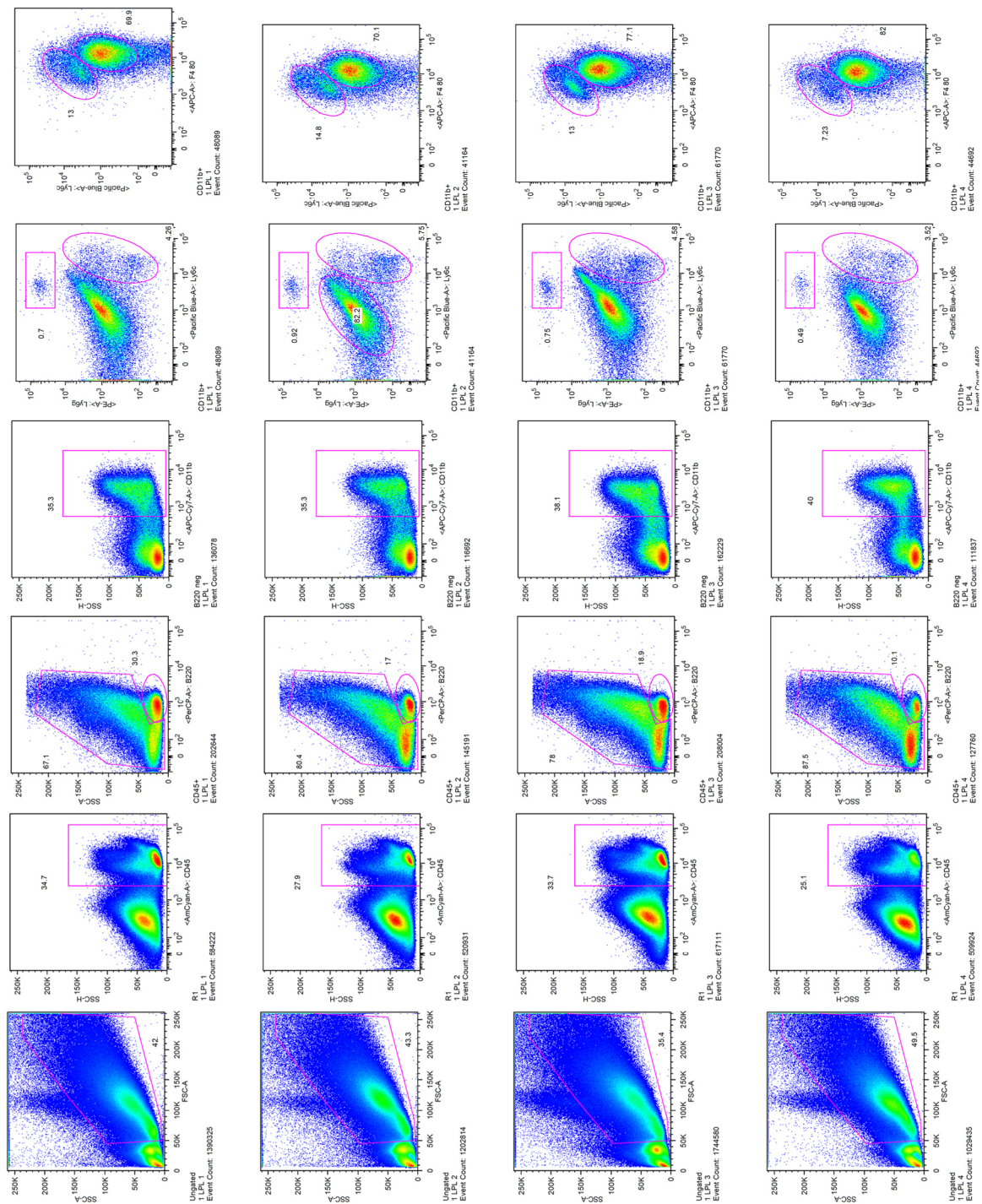




**Abbildung 65: Einfluss einer initialen AOM-Injektion und Spezialdiäten auf das intestinale Mikrobiom.** WT Tiere wurden nach initialer AOM-Gabe (15 mg/kg KG) 162 Tage mit Eisencitrat oder Häm-Eisen gefüttert. Die bakterielle DNA wurde aus Stuhl pellets der angegebenen Zeitpunkte isoliert. A)  $\beta$ -Diversität wird als Bray-Curtis-Index angegeben. Gezeigt sind Einzelwerte (n=5). B) das Verhältnis zwischen *Bacteroidetes* zu *Firmicutes*. C) Klassifizierung der Bakterienfamilie. Anzahl der intestinalen Bakterienfamilien sind als absolute Werte mittels *Heat-map*-Diagramm angegeben (n=5).



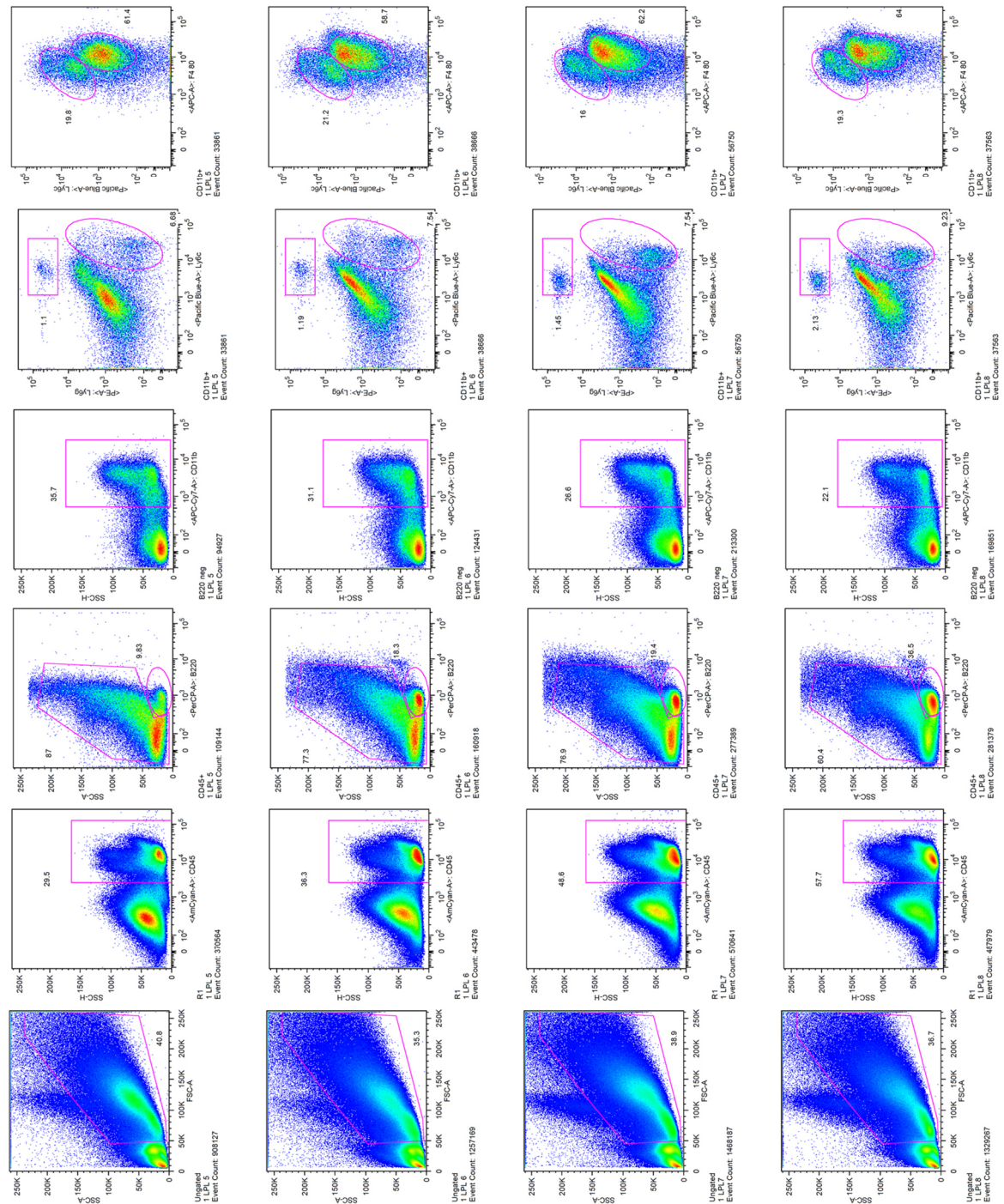
## WT LPL Teil 1 S.1



**Abbildung 66: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.1).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

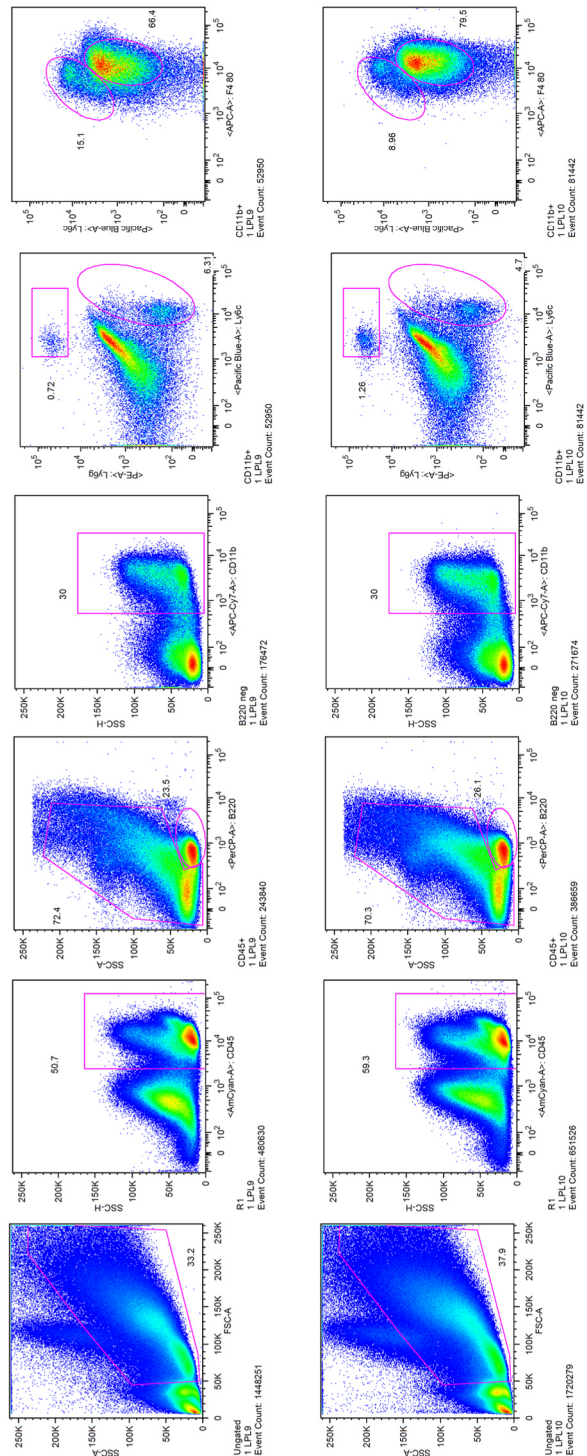
## WT LPL Teil 1 S.2



**Abbildung 67: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.1).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

## WT LPL Teil 1 S.3

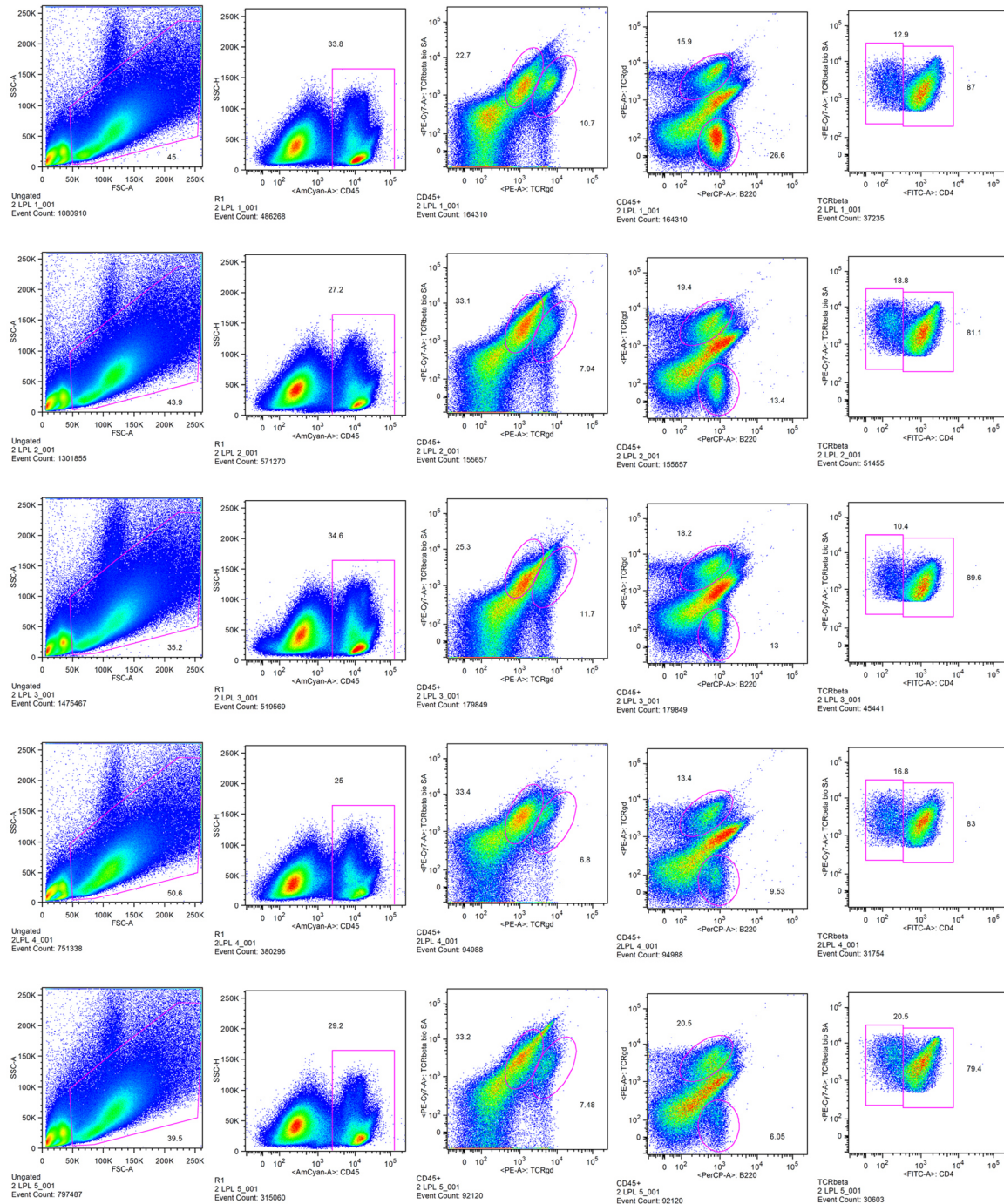


**Abbildung 68: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 1 S.3).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



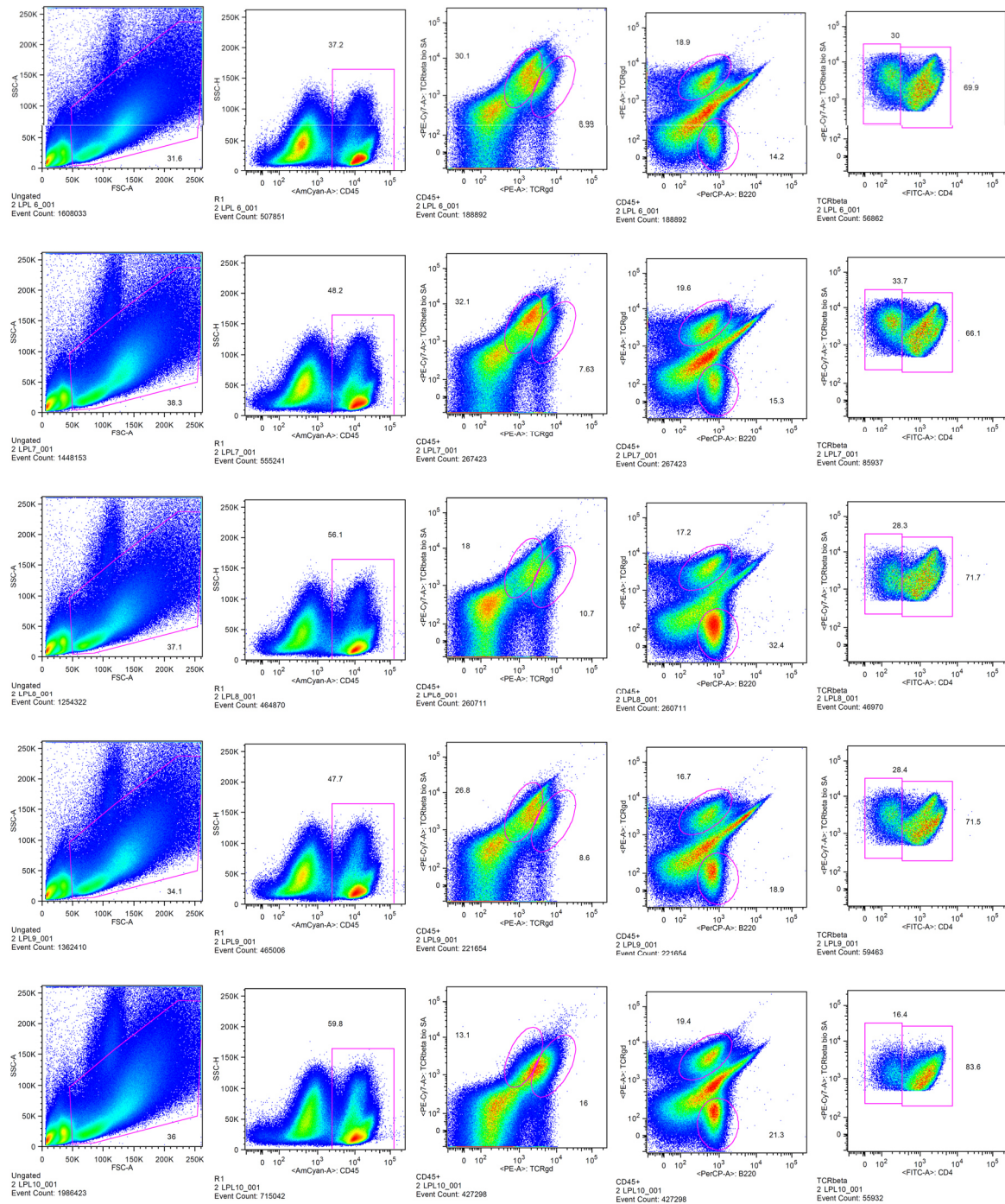
## WT LPL Teil 2 S.1



**Abbildung 69: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 2 S.1).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

## WT LPL Teil 2 S.2

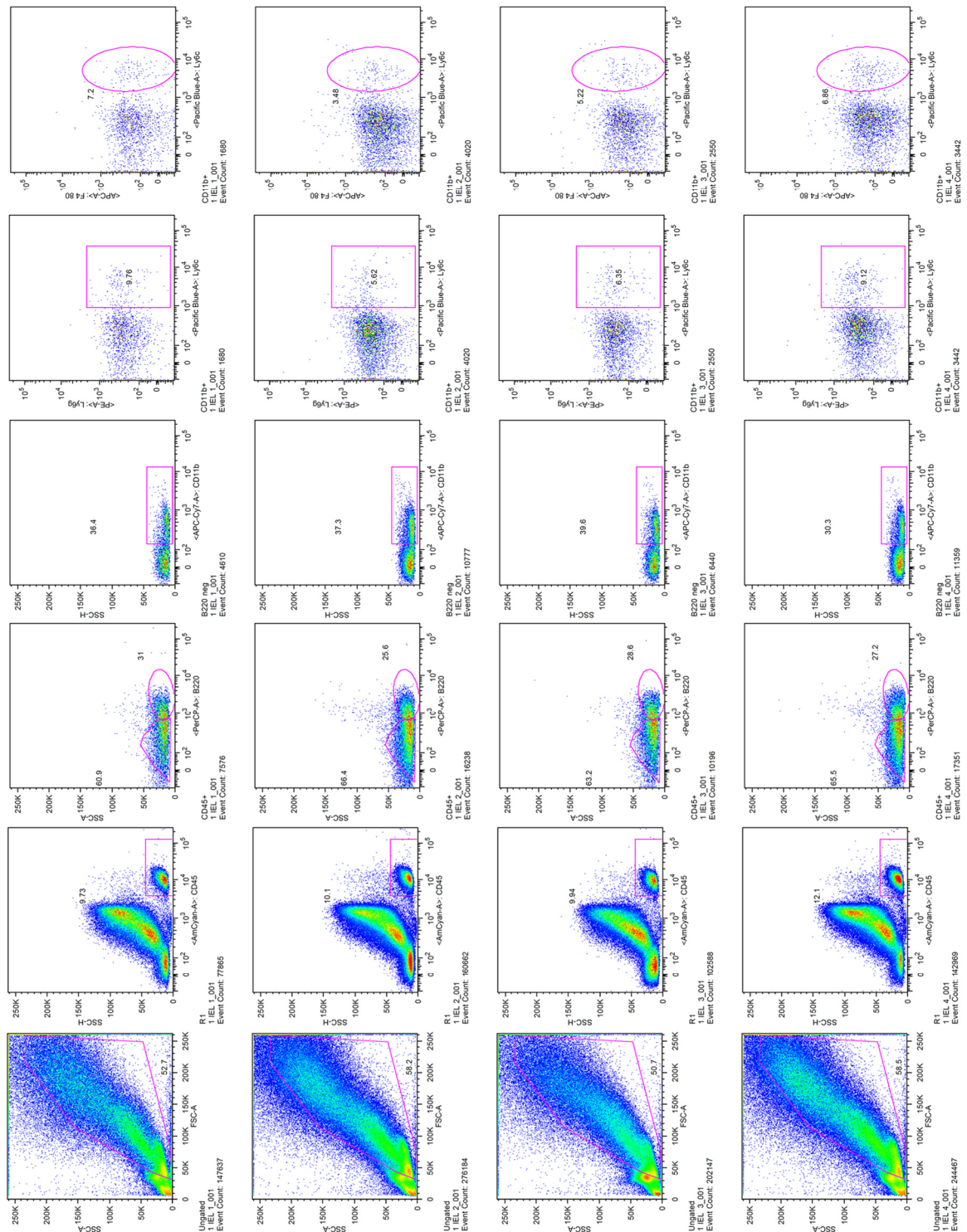


**Abbildung 70: Gating der FACS-Analysen des LPL von WT Tieren (Teil 2 S.2).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



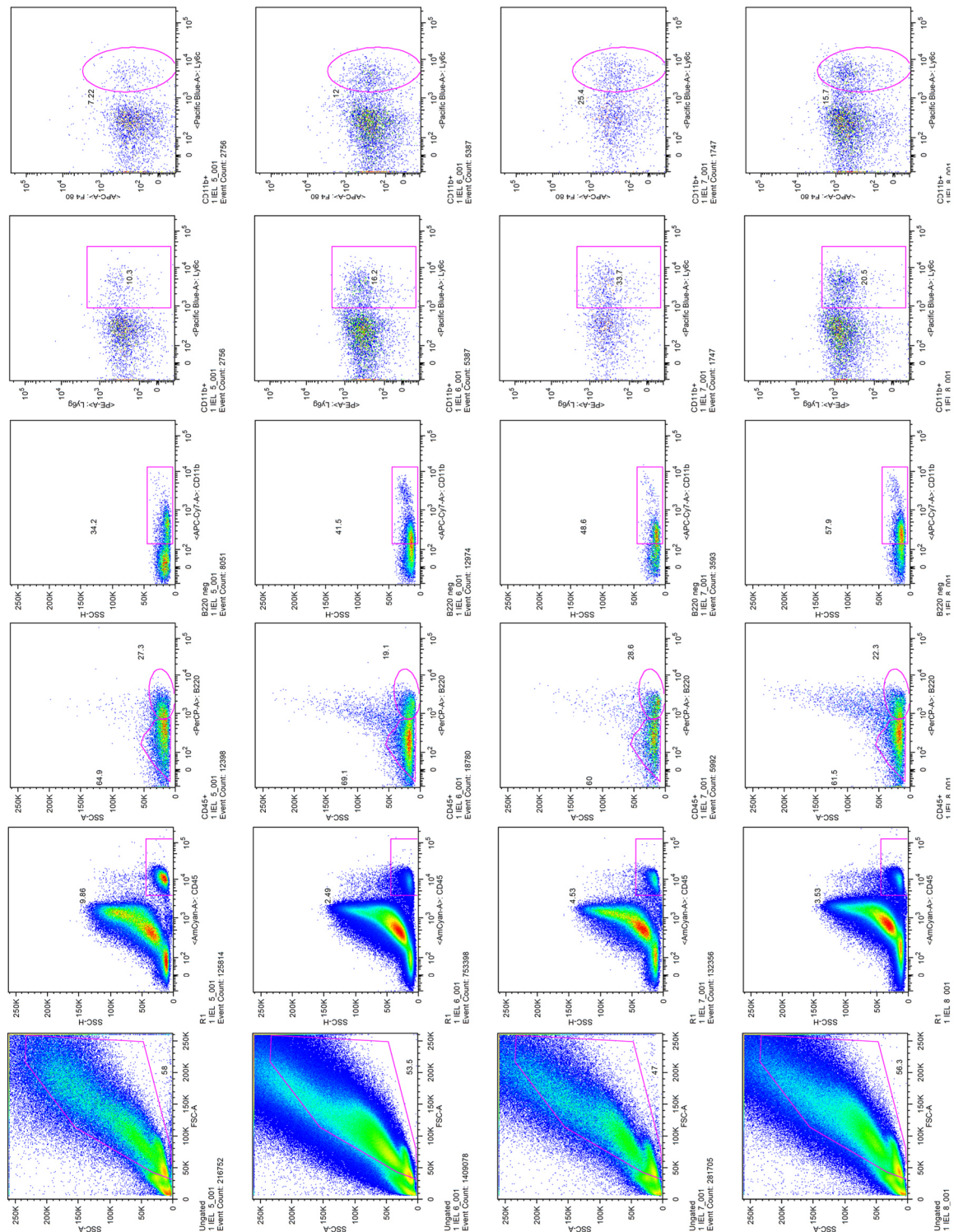
## WT IEL Teil 1 S.1



**Abbildung 71: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.1).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

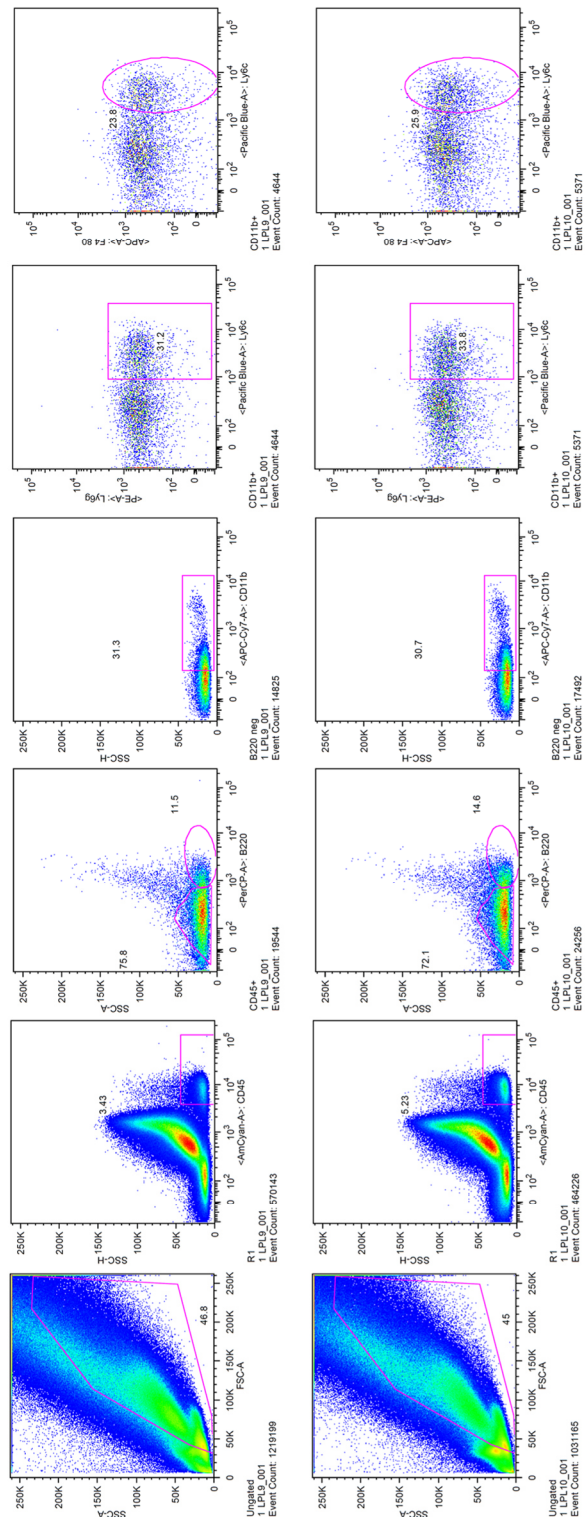
## WT IEL Teil1 S.2



**Abbildung 72: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.2).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

## WT IEL Teil 1 S.3

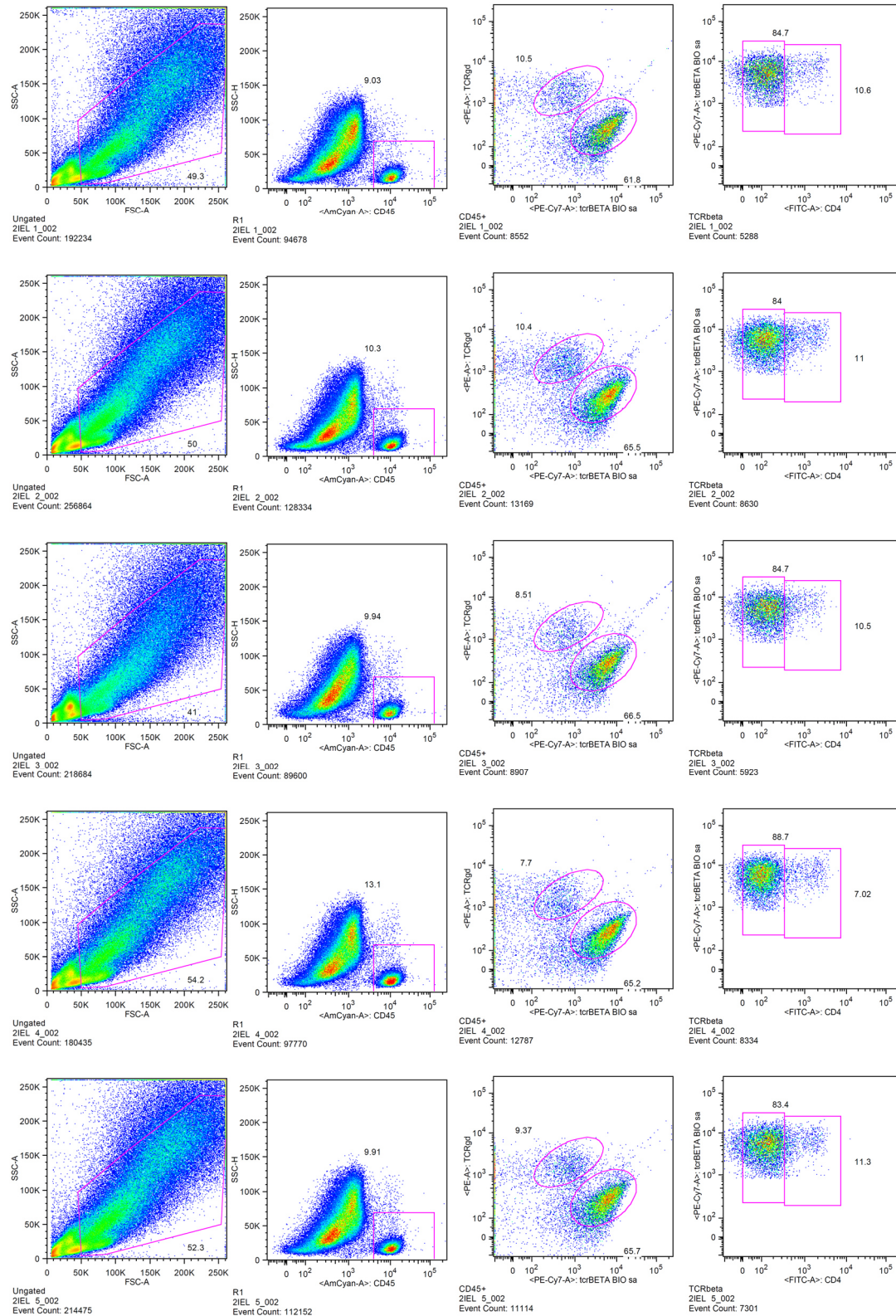


**Abbildung 73: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 1 S.3).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



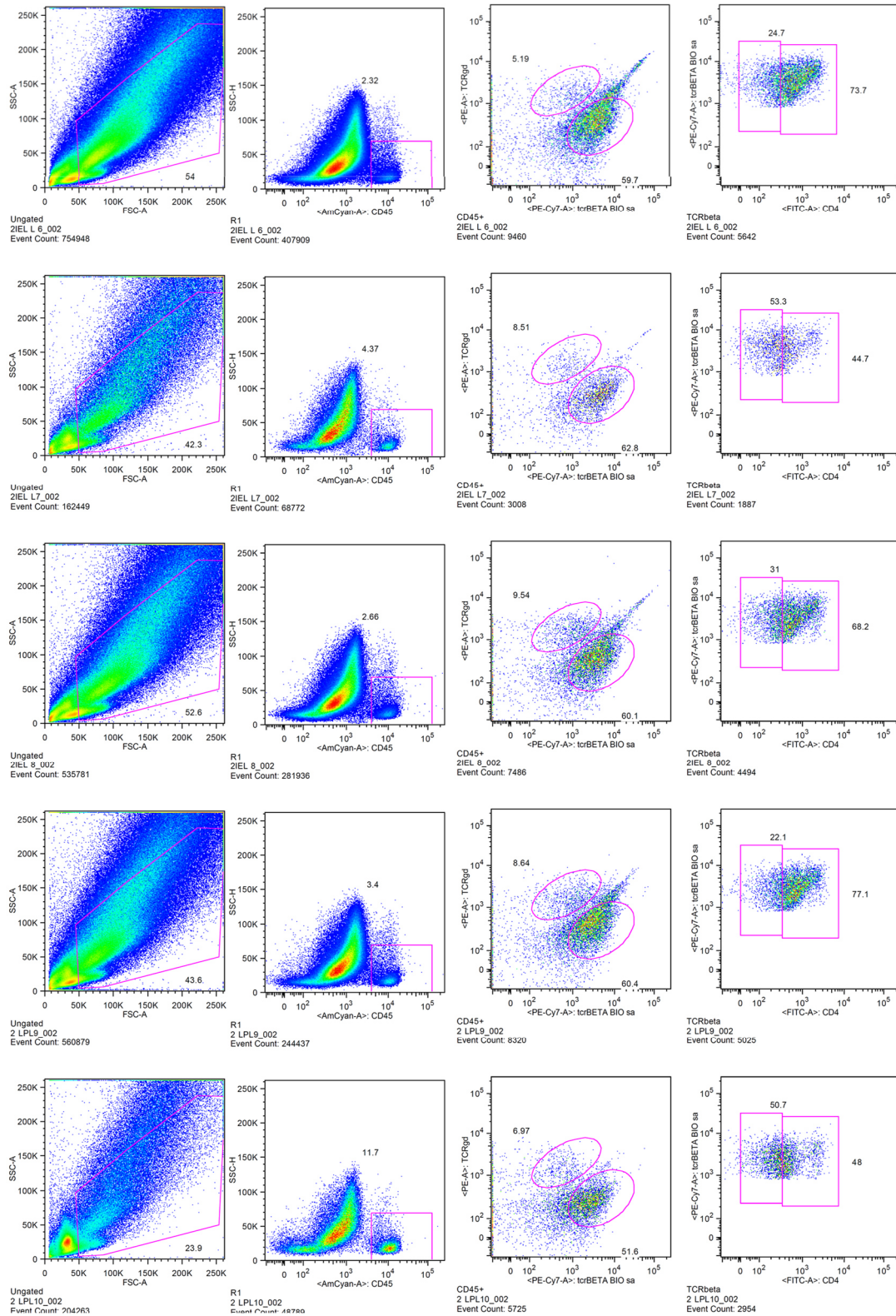
## WT IEL Teil 2 S.1



**Abbildung 74: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 2 S.1).**

WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

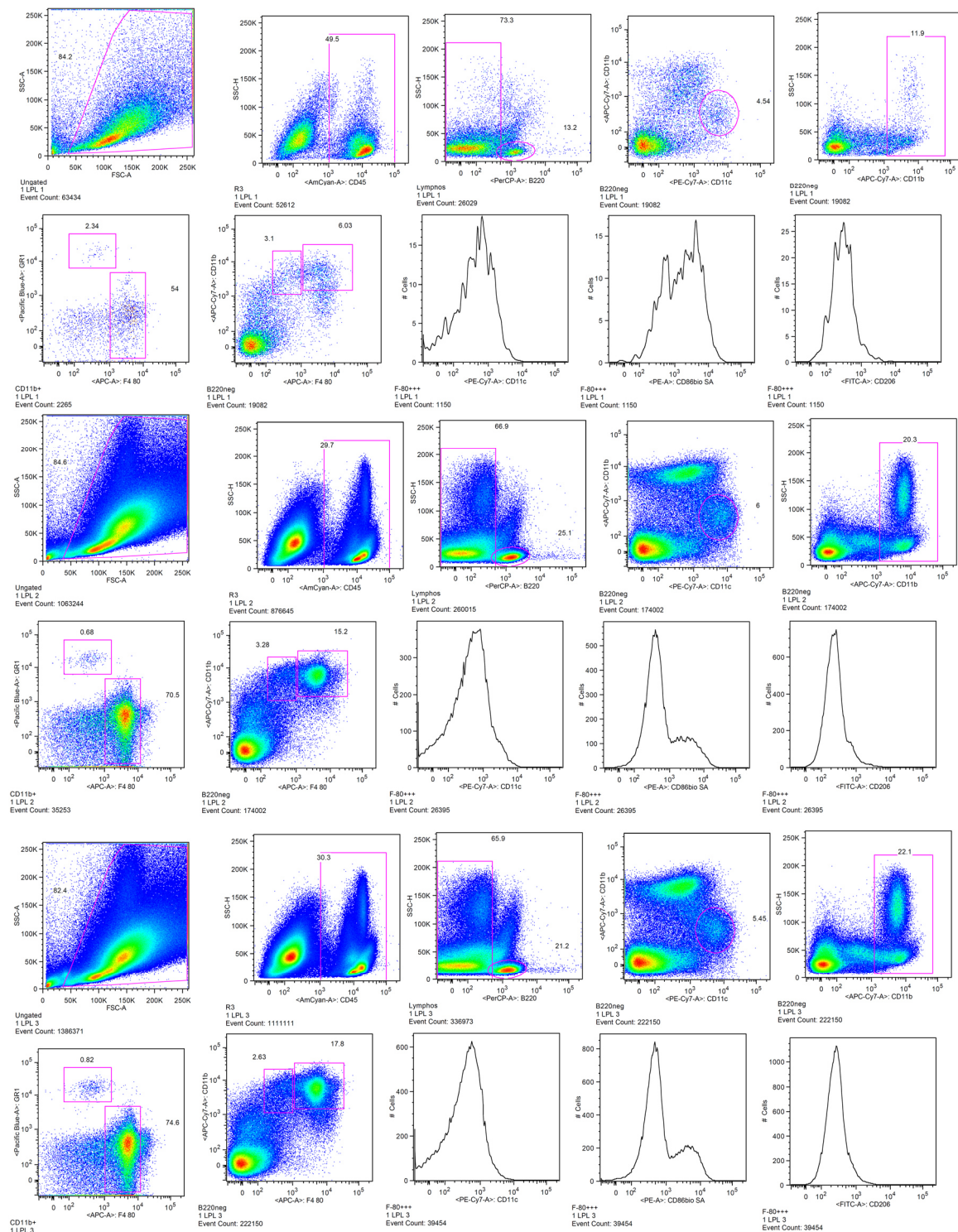
## WT IEL Teil 2 S.2



**Abbildung 75: Gating der FACS-Analysen des IEL von WT Tieren (Teil 2 S.2).**

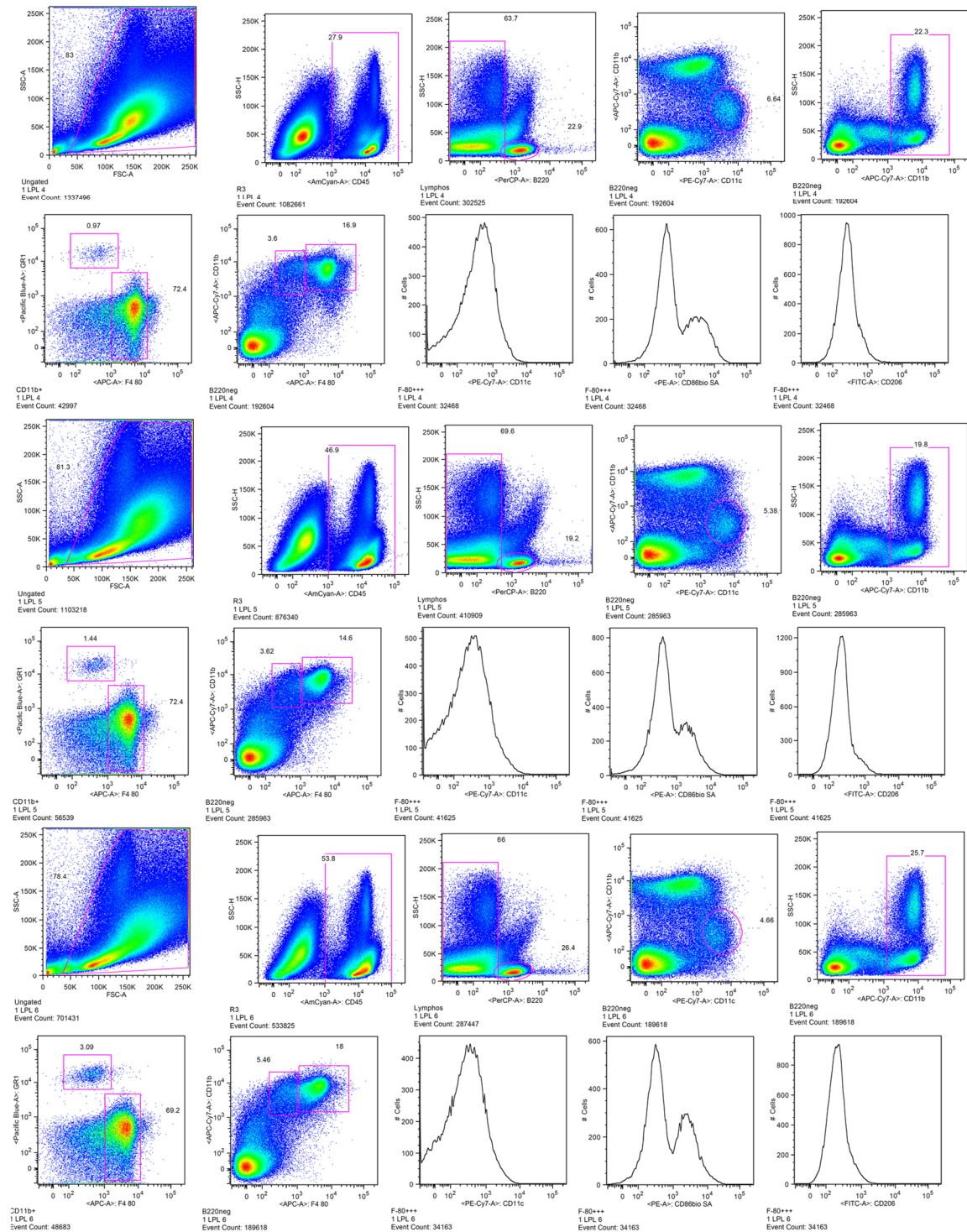
WT Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



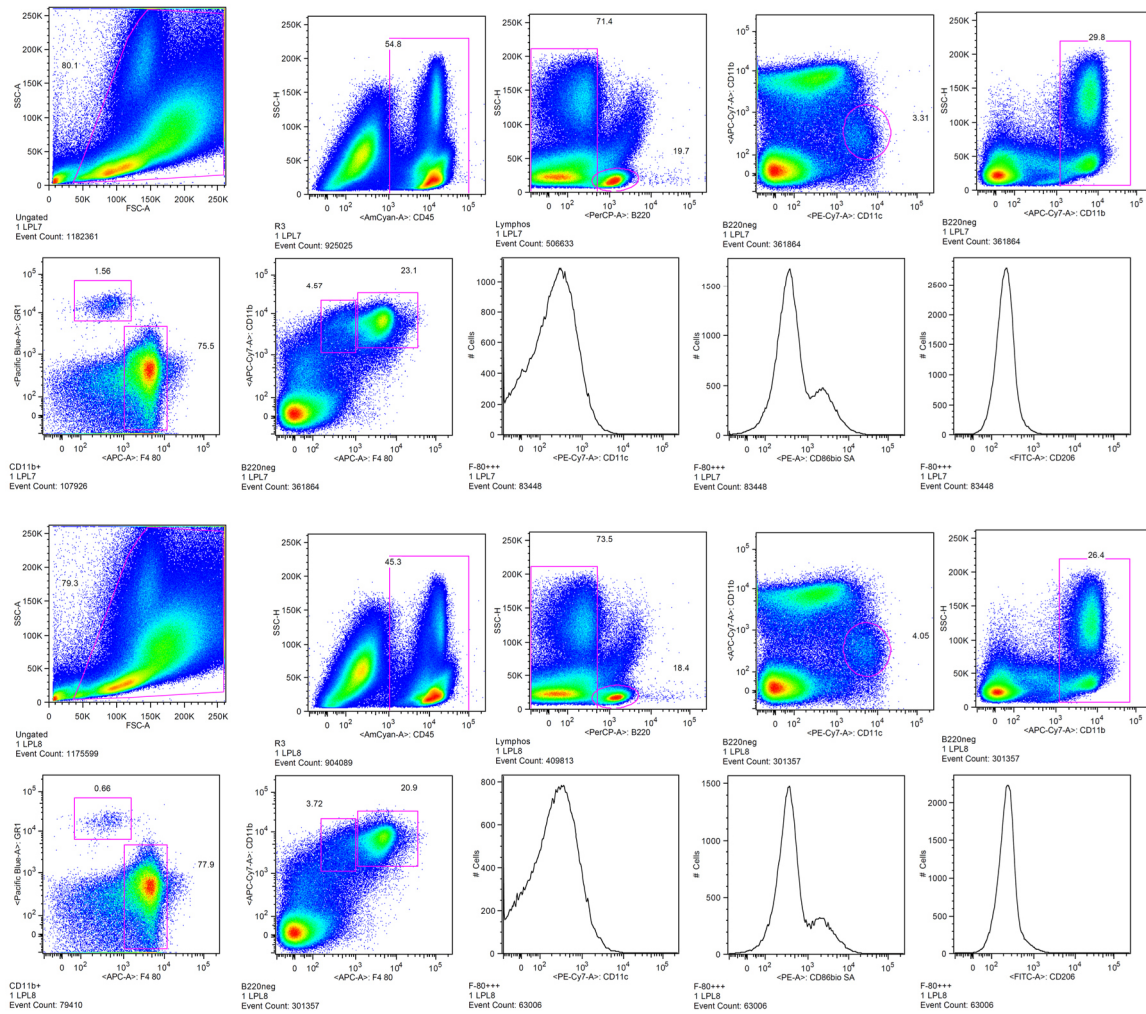
MGMT<sup>-/-</sup> LPL Teil 1 S.1

**Abbildung 76: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.1).**

MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die Gatings anhand von Dotplots der FACS-Analysen.

MGMT<sup>-/-</sup> LPL Teil 1 S.2Abbildung 77: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.2).

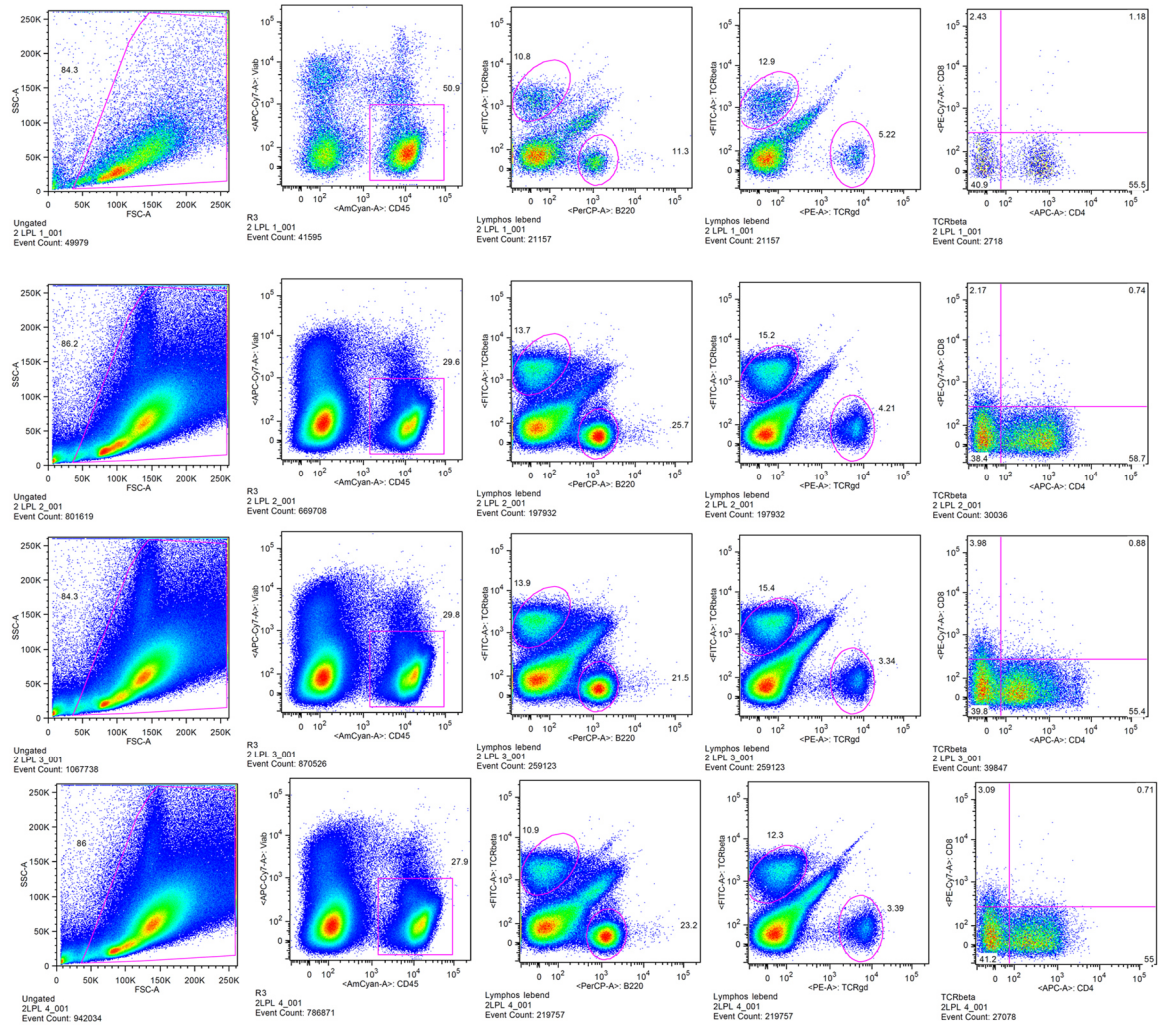
MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

MGMT<sup>-/-</sup> LPL Teil 1 S.3

**Abbildung 78: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.3).**

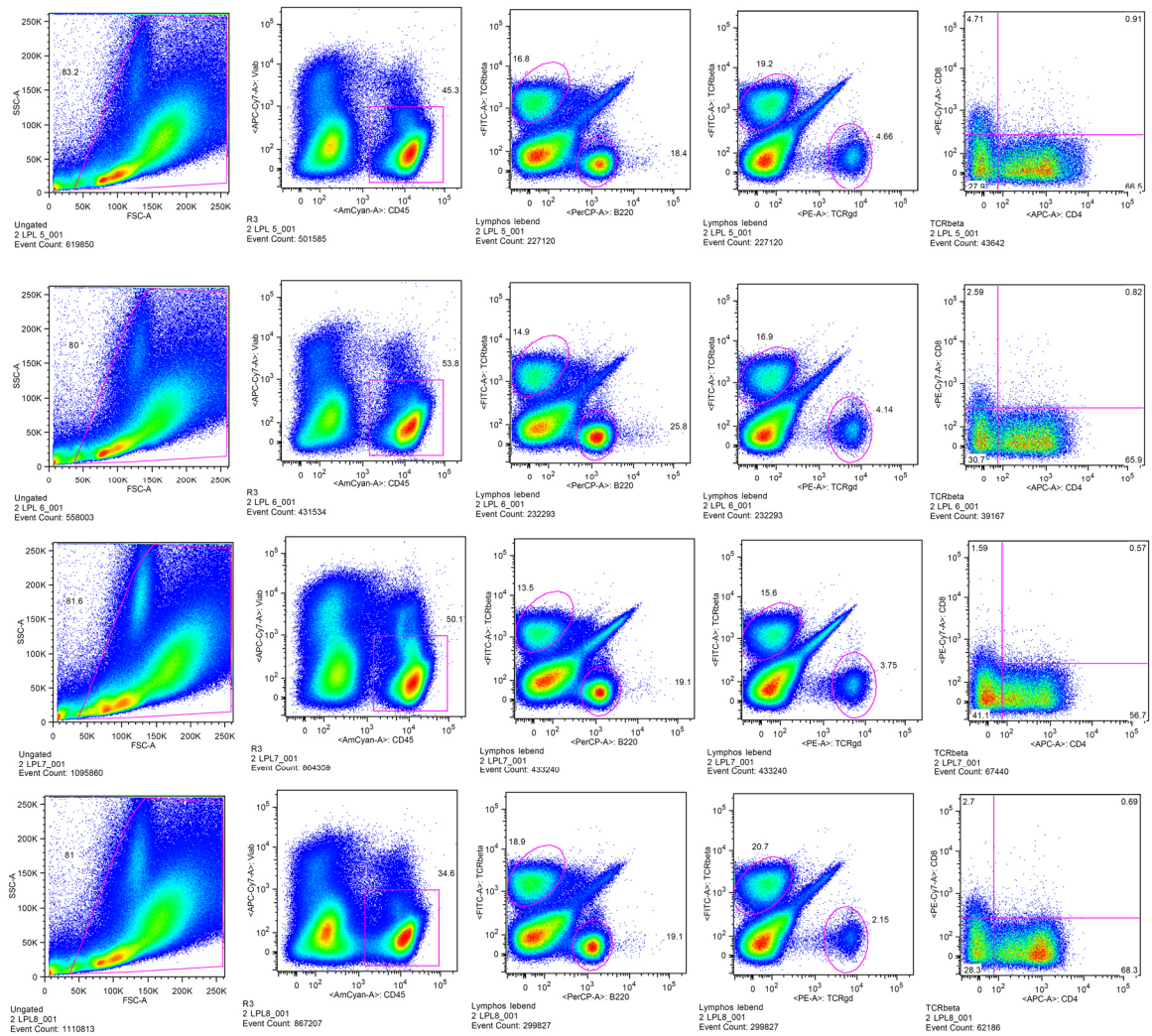
MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



MGMT<sup>-/-</sup> LPL Teil 2 S.1

**Abbildung 79: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.1).**

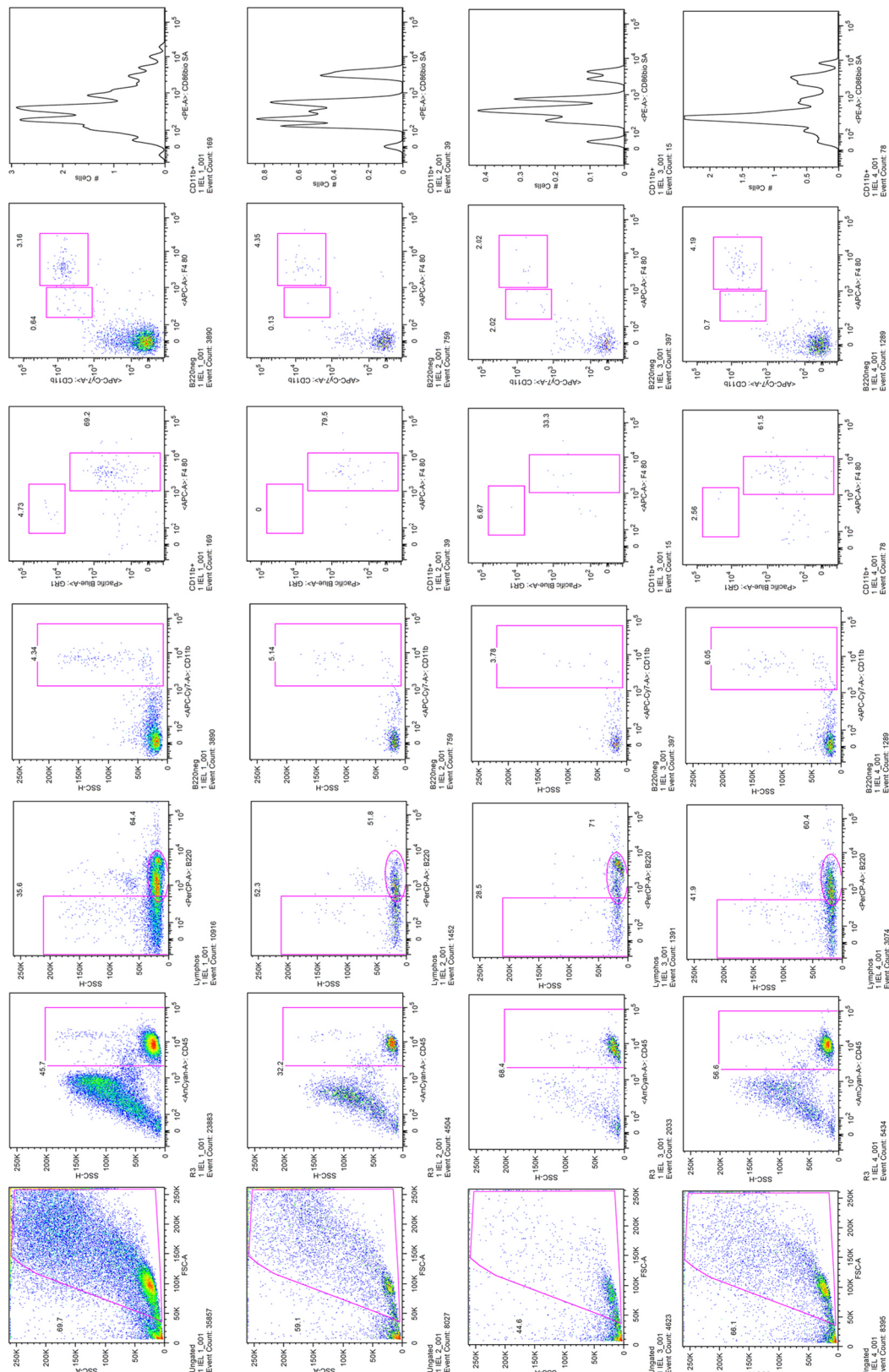
MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die Gatings anhand von Dotplots der FACS-Analysen.

MGMT<sup>-/-</sup> LPL Teil 2 S.2

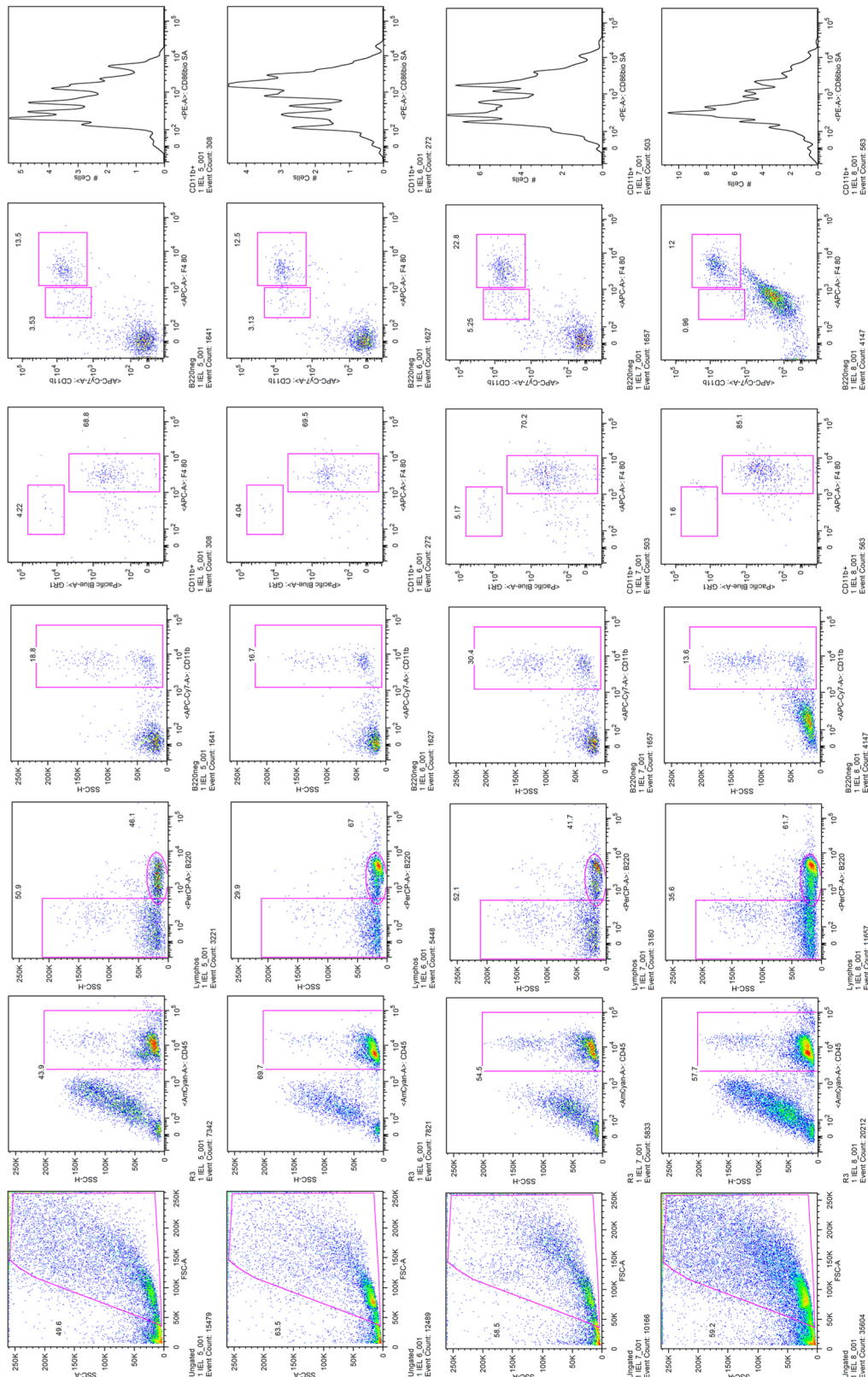
**Abbildung 80: Gating der FACS-Analysen des LPL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.2).**

MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die LPL isoliert. Gezeigt sind die Gatings anhand von Dotplots der FACS-Analysen.



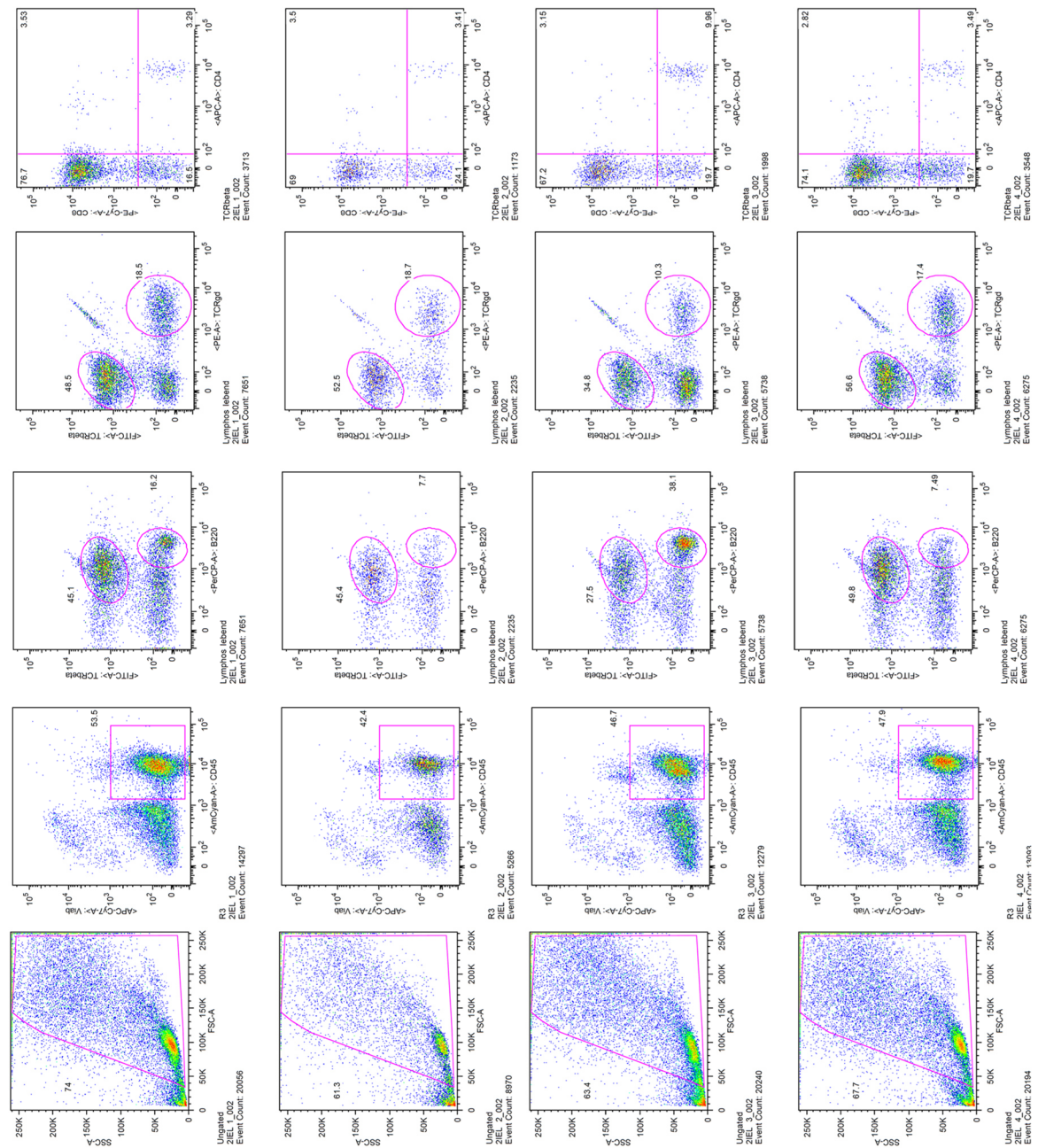
MGMT<sup>-/-</sup> IEL Teil 1 S.1Abbildung 81: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.1).

MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die Gatings anhand von Dotplots der FACS-Analysen.

MGMT<sup>-/-</sup> IEL Teil 1 S.2

**Abbildung 82: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 1 S.2).**

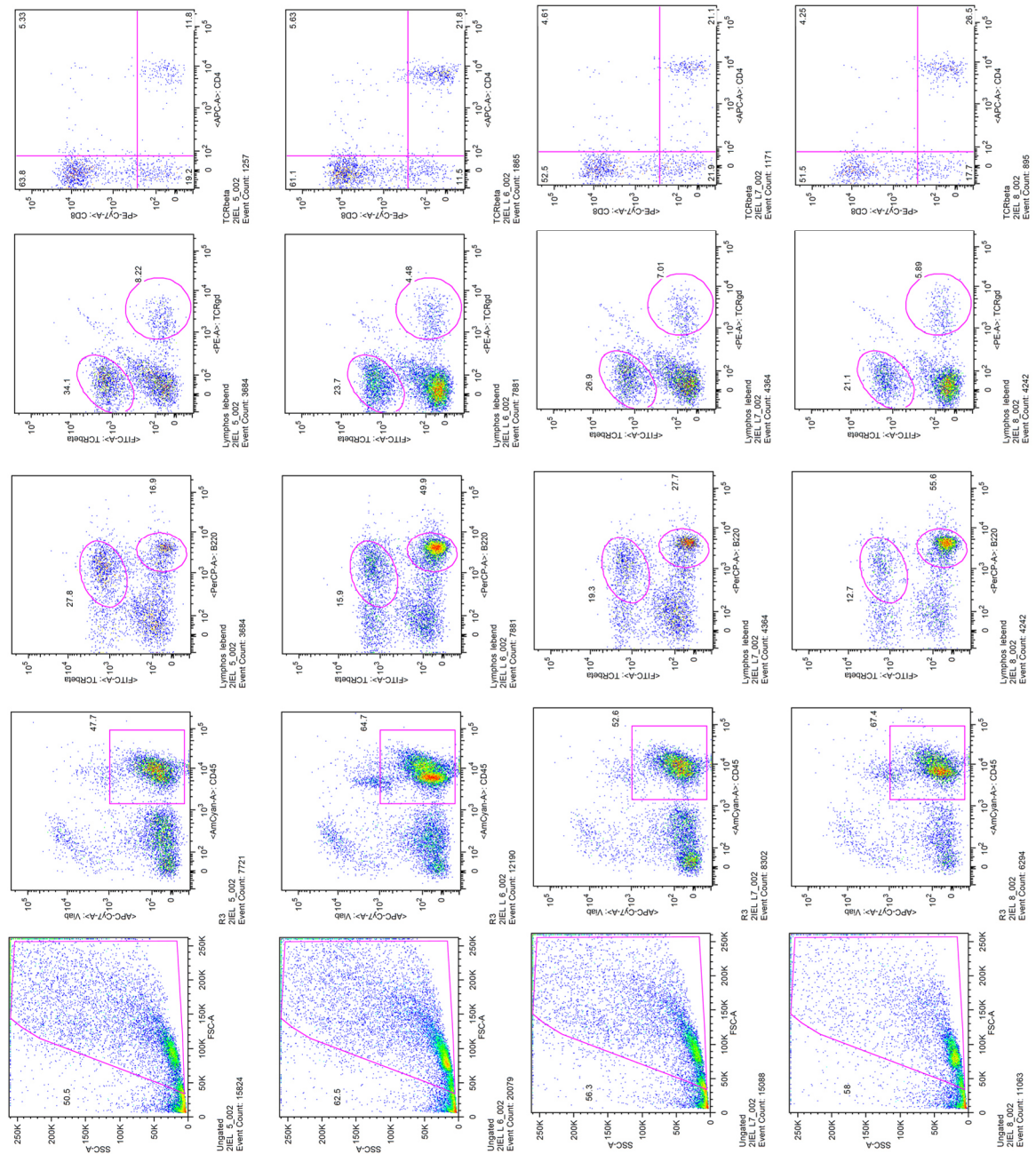
MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

MGMT<sup>-/-</sup> IEL Teil 2 S.1

**Abbildung 83: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.1).**

MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.



MGMT<sup>-/-</sup> IEL Teil 2 S.2

**Abbildung 84: Gating der FACS-Analysen des IEL von MGMT<sup>-/-</sup> Tieren (Teil 2 S.2).**

MGMT<sup>-/-</sup> Tiere wurden 21 Tage mit Eisencitrat und Häm-Eisen gefüttert und die IEL isoliert. Gezeigt sind die *Gatings* anhand von *Dotplots* der FACS-Analysen.

## Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

## Lebenslauf

**Nina Susanne Seiwert**

### Akademischer Bildungsweg

- |                 |   |
|-----------------|---|
| seit 01/2019    | <b>wissenschaftliche Mitarbeiterin</b><br>Technische Universität Kaiserslautern<br>Lebensmittelchemie und Toxikologie <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Jörg Fahrer</li> </ul>  |
| 04/2015-heute   | <b>Promotion Chemie</b><br>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz/ Justus-Liebig Universität Gießen/ Technische Universität Kaiserslautern <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Jörg Fahrer</li> <li>• Doktorarbeit: ITox Mainz, RBI Gießen, Lebensmittelchemie und Toxikologie Kaiserslautern</li> </ul>            |
| 05/2013-04/2015 | <b>Master of Science Biologie</b><br>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz <ul style="list-style-type: none"> <li>• Masterarbeit: Institut für Toxikologie, Unimedizin Mainz</li> <li>• Thema: „Untersuchung der Autophagie nach DNA-Doppelstrangbrüchen durch das bakterielle Genotoxin CDT im Vergleich zu ionisierender Strahlung“</li> </ul> |
| 04/2010-05/2013 | <b>Bachelor of Science Biologie</b><br>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bachelorarbeit: Institut für Molekulargenetik</li> <li>• Thema: „Funktionsanalyse des Hämoglobin 1 in <i>Drosophila melanogaster</i>“</li> </ul>   |

### Weiterbildungen

- |         |   |
|---------|---|
| 09/2019 | <b>Weiterbildung zum Fachtoxikologen der DGPT</b><br>Absolvierter Kurs: Lebensmitteltoxikologie (Kaiserslautern)  |
| 06/2017 | <b>Statistische Auswertung mit der Software IBM®SPSS®</b><br>Universitätsmedizin Mainz, Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) |
| 10/2015 | <b>Tierversuchskundekurs FELASA-B</b><br>Universitätsmedizin Mainz, Translational Animal Research Center (TARC)   |

### Mitgliedschaften

- Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)
- Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparatur (DGDR)
- Gesellschaft für Toxikologie (GT) in der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)

## Publikationsliste

**Seiwert N.**, Stroh S., Zillmer H., Döhring J., Steinberg P., Adams P., Hövelmeyer N., Wirtz S., Kaina B., Först S., Fahrner J. Dietary heme alters intestinal microbiota and induces chronic intestinal inflammation with colorectal tumor formation. *In Vorbereitung*.

**Seiwert N.**, Fahrner J., Nagel G., Frank J., Behnam D., Kaina B. (2020, *submitted*) Curcumin administered as micellar solution suppresses intestinal inflammation and colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*.

**Seiwert N.**, Heylmann D., Hasselwander S., Fahrner J. (2020) Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *BBA Reviews on Cancer*.

Neitzel C., **Seiwert N.**, Göder A., Diehl E., Weber C., Nagel G., Stroh S., Rasenberger B., Christmann M., Fahrner J. (2019) Lipoic acid synergizes with antineoplastic drugs in colorectal cancer by targeting p53 for proteasomal degradation. *Cells*

Rund K. M., Heylmann D., **Seiwert N.**, Wecklein S., Oger C., Galano J. M., Durand T., Chen R., Gueler F., Fahrner J., Bornhorst J., Schebb N. H. (2019) Formation of trans-epoxy fatty acids correlates with formation of isoprostanes and could serve as biomarker of oxidative stress. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*

Kraus A., McKeague M., **Seiwert N.**, Nagel G., Geisen S. M., Ziegler N., Trantakis IA, Kaina B., Thomas A. D., Sturla S. J., Fahrner J. (2019) Immunological and mass spectrometry-based approaches to determine thresholds of the mutagenic DNA adduct O<sup>6</sup>-methylguanine *in vivo*. *Archives of Toxicology*.

Dörsam B., **Seiwert N.**, Först S., Stroh S., Nagel G., Begaliew D., Diehl E., Kraus A., McKeague M., Minneker V., Roukos V., Reißig S., Waisman A., Moehler M., Stier A., Mangerich A., Dantzer F., Kaina B., Fahrner J. (2018) PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Rund K. M., Ostermann A. I., Kutzner L., Galano J.-M., Oger C., Wecklein S., **Seiwert N.**, Durand T., Schebb N. H. (2018) Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isoflurans derived from the major n3- and n6-PFUAs. *Analytica Chimica Acta*.

**Seiwert N.**, Neitzel C., Stroh S., Frisan T., Audebert M., Toulany M., Kaina B., Fahrner J. (2017) AKT2 suppresses pro-survival autophagy triggered by DNA double-strand breaks in colorectal cancer cells. *Cell death and diseases*.

Burmester T., Wawrowski A., Diepenbruck I., Schrick K., **Seiwert N.**, Ripp F., Prothmann A., Hankeln T. (2017) Divergent roles of the *Drosophila melanogaster* globins. *J Insect Physiology*.

Mimmler M., Peter S., Kraus A., Stroh S., Nikolova T., **Seiwert N.**, Hasselwander S., Neitzel C., Haub J., Monien BH, Nicken P., Steinberg P., Shay J. W., Kaina B., Fahrner J. (2016) DNA damage response curtails detrimental replication stress and chromosomal instability induced by the dietary carcinogen PhIP. *Nucleic Acids Res*.

Göder A., Nagel G., Kraus A., Dörsam B., **Seiwert N.**, Kaina B., Fahrner J. (2015) Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)



and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction. *Carcinogenesis*.

Dörsam B., Göder A., **Seiwert N.**, Kaina B. and Fahrer J. (2014) Lipoic acid induces p53-independent cell death in colorectal cancer cells and potentiates the cytotoxicity of 5-fluorouracil. *Archives of Toxicology*.

## Kongressteilnahme

09/2019	GUM (Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung) 2019, Basel Vortrag (Reisestipendium)
02/2019	4th German Pharm-Tox Summit (DGPT) 2019, Stuttgart Vortrag (Reisestipendium)
09/2018	Frankfurt Cancer Conference 2018, Frankfurt Posterpräsentation
09/2018	Deutsche Gesellschaft für DNA Reparatur (DGDR) 2018, Karlsruhe Posterpräsentation (Reisestipendium)
02-03/2018	3rd German Pharm-Tox Summit (DGPT) 2018, Göttingen Posterpräsentation, gewürdigt mit dem Posterpreis der GT
10/2017	GUM Nachwuchsförderung 2017, Würzburg Vortrag
09/2017	3rd German-French DNA Reparatur Meeting 2017, Köln Posterpräsentation (Reisestipendium)
08/2017	TransMed Science day 2017, Mainz Vortrag
03/2017	2nd German Pharm-Tox Summit (DGPT) 2017, Heidelberg Vortrag
11/2016	Symposium "DNA damage response, genetic instability and cancer" 2016, Mainz: Vortrag
10/2016	GUM (Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung) 2016, München Vortrag (Reisestipendium)
02-03/2016	German Pharm-Tox Summit (DGPT) 2016, Berlin Posterpräsentation

## Literaturverzeichnis

- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782-787. doi: 10.1038/35021228
- Alam, M. Z., Devalaraja, S., & Haldar, M. (2017). The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology. *Frontiers in immunology*, 8, 33. doi: 10.3389/fimmu.2017.00033
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T. J., . . . Jobin, C. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*, 338(6103), 120-123. doi: 10.1126/science.1224820
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., . . . Neurath, M. F. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine*, 6(5), 583-588. doi: 10.1038/75068
- Aumüller, G., Aust, G., & Conrad, A., & al., E. (2017). *Anatomie* doi:doi: 10.1055/b-005-143674
- Awasthi, Y. C., Sharma, R., Cheng, J. Z., Yang, Y., Sharma, A., Singhal, S. S., & Awasthi, S. (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 219-230.
- Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. doi: 10.1155/2014/360438
- Bain, C. C., & Schridde, A. (2018). Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 2733. doi: 10.3389/fimmu.2018.02733
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., . . . Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244(4901), 217-221.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., & Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 249(4971), 912-915.
- Balish, E., & Warner, T. (2002). Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *The American journal of pathology*, 160(6), 2253-2257. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61172-8
- Baradat, Jouanin, I., Dalleau, S., Tache, S., Gieules, M., Debrauwer, L., . . . Gueraud, F. (2011). 4-Hydroxy-2(E)-nonenal metabolism differs in Apc(+/+) cells and in Apc(Min/+) cells: it may explain colon cancer promotion by heme iron. *Chemical research in toxicology*, 24(11), 1984-1993. doi: 10.1021/tx2003036
- Barrett, J. C., & Wiseman, R. W. (1987). Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*, 76, 65-70. doi: 10.1289/ehp.877665
- Bartnikas, T. B., Andrews, N. C., & Fleming, M. D. (2011). Transferrin is a major determinant of hepcidin expression in hypotransferrinemic mice. *Blood*, 117(2), 630-637. doi: 10.1182/blood-2010-05-287359
- Bastide, Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R. L., Tache, S., Naud, N., . . . Pierre, F. H. (2015). A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer research*, 75(5), 870-879. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2554
- Bastide, Morois, S., Cadeau, C., Kangas, S., Serafini, M., Gusto, G., . . . Boutron-Ruault, M. C. (2016). Heme Iron Intake, Dietary Antioxidant Capacity, and Risk of Colorectal Adenomas in a Large Cohort Study of French Women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 25(4), 640-647. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0724

- Bastide, Pierre, F. H., & Corpet, D. E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer prevention research*, 4(2), 177-184. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113
- Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M., & Issa, J. P. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in cancer research*, 72, 141-196.
- Bechaux, J., de La Pomelie, D., Theron, L., Sante-Lhoutellier, V., & Gatellier, P. (2018). Iron-catalysed chemistry in the gastrointestinal tract: Mechanisms, kinetics and consequences. A review. *Food chemistry*, 268, 27-39. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.018
- Becker, C., Fantini, M. C., & Neurath, M. F. (2006). High resolution colonoscopy in live mice. *Nature protocols*, 1(6), 2900-2904. doi: 10.1038/nprot.2006.446
- Becker, C., Neurath, M. F., & Wirtz, S. (2015). The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR journal*, 56(2), 192-204. doi: 10.1093/ilar/ilv030
- Behnsnlian, D., Butz, P., Greiner, R., & Lautenschlaeger, R. (2014). Process-induced undesirable compounds: chances of non-thermal approaches. *Meat science*, 98(3), 392-403. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.06.038
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation research*, 231(1), 11-30.
- Beule, A. G. (2018). [The Microbiome - The Unscheduled Parameter for Future Therapies]. *Laryngo- rhino- otologie*, 97(S 01), S279-S311. doi: 10.1055/s-0043-122301
- Bingham, S. A., Hughes, R., & Cross, A. J. (2002). Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *The Journal of nutrition*, 132(11 Suppl), 3522S-3525S. doi: 10.1093/jn/132.11.3522S
- Bingham, S. A., Pignatelli, B., Pollock, J. R., Ellul, A., Malaveille, C., Gross, G., . . . O'Neill, I. K. (1996). Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*, 17(3), 515-523.
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087 e2073. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064
- Boland, C. R., Koi, M., Chang, D. K., & Carethers, J. M. (2008). The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Familial cancer*, 7(1), 41-52. doi: 10.1007/s10689-007-9145-9
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., . . . Nougayrede, J. P. (2018). The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *mBio*, 9(2). doi: 10.1128/mBio.02393-17
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., . . . International Agency for Research on Cancer Monograph Working, G. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet. Oncology*, 16(16), 1599-1600. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1
- Bovee-Oudenhoven, I. M., Wissink, M. L., Wouters, J. T., & Van der Meer, R. (1999). Dietary calcium phosphate stimulates intestinal lactobacilli and decreases the severity of a salmonella infection in rats. *The Journal of nutrition*, 129(3), 607-612. doi: 10.1093/jn/129.3.607
- Braun, V., & Hantke, K. (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 15(2), 328-334. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.01.005
- Briegert, M., Enk, A. H., & Kaina, B. (2007). Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA repair*, 6(9), 1255-1263. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.008
- Brookes, M. J., Boulton, J., Roberts, K., Cooper, B. T., Hotchin, N. A., Matthews, G., . . . Tselepis, C. (2008). A role for iron in Wnt signalling. *Oncogene*, 27(7), 966-975. doi: 10.1038/sj.onc.1210711

- Brown, K., Hingerty, B. E., Guenther, E. A., Krishnan, V. V., Broyde, S., Turteltaub, K. W., & Cosman, M. (2001). Solution structure of the 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine C8-deoxyguanosine adduct in duplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8507-8512. doi: 10.1073/pnas.151251898
- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., . . . Bonnet, R. (2013). High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS one*, 8(2), e56964. doi: 10.1371/journal.pone.0056964
- Bugni, J. M., Meira, L. B., & Samson, L. D. (2009). Alkylation-induced colon tumorigenesis in mice deficient in the Mgmt and Msh6 proteins. *Oncogene*, 28(5), 734-741. doi: 10.1038/onc.2008.426
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292(1), G315-322. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2006
- Calmels, S., Ohshima, H., Henry, Y., & Bartsch, H. (1996). Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. *Carcinogenesis*, 17(3), 533-536. doi: 10.1093/carcin/17.3.533
- Calvo, J. A., Meira, L. B., Lee, C. Y., Moroski-Erkul, C. A., Abolhassani, N., Taghizadeh, K., . . . Samson, L. D. (2012). DNA repair is indispensable for survival after acute inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2680-2689. doi: 10.1172/JCI63338
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., . . . Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281(5383), 1677-1679. doi: 10.1126/science.281.5383.1677
- Chakravarti, D., Ibeanu, G. C., Tano, K., & Mitra, S. (1991). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *The Journal of biological chemistry*, 266(24), 15710-15715.
- Chan, A. O., Broadbush, R. R., Houlihan, P. S., Issa, J. P., Hamilton, S. R., & Rashid, A. (2002). CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *The American journal of pathology*, 160(5), 1823-1830. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61128-5
- Chao, A. (1984). Nonparametric-Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand J Stat*, 11(4), 265-270.
- Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Reddy, G. R., Yeola, S. N., Morrow, J. D., Blair, I. A., & Marnett, L. J. (1994). Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 265(5178), 1580-1582.
- Chen, T., Yang, I., Irby, R., Shain, K. H., Wang, H. G., Quackenbush, J., . . . Yeatman, T. J. (2003). Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer research*, 63(15), 4368-4374.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3-34. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00287-7
- Clevers, H. (2004). Wnt breakers in colon cancer. *Cancer cell*, 5(1), 5-6.
- Conrad, M. E., & Umbreit, J. N. (2002). Pathways of iron absorption. *Blood cells, molecules & diseases*, 29(3), 336-355.
- Conrad, M. E., Umbreit, J. N., Moore, E. G., Hainsworth, L. N., Porubcin, M., Simovich, M. J., . . . Garrick, M. D. (2000). Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(4), G767-774. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.4.G767
- Constante, M., Fragoso, G., Calve, A., Samba-Mondonga, M., & Santos, M. M. (2017). Dietary Heme Induces Gut Dysbiosis, Aggravates Colitis, and Potentiates the

- Development of Adenomas in Mice. *Frontiers in microbiology*, 8, 1809. doi: 10.3389/fmicb.2017.01809
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195-1214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., . . . Bonnet, R. (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*, 63(12), 1932-1942. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305257
- Crichton, R. R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R. J. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of inorganic biochemistry*, 91(1), 9-18. doi: 10.1016/S0162-0134(02)00461-0 M4 - Citavi
- Cross, Pollock, J. R., & Bingham, S. A. (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer research*, 63(10), 2358-2360.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., & Nougayrede, J. P. (2010). Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11537-11542. doi: 10.1073/pnas.1001261107
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., & Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet*, 375(9719), 1030-1047. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4
- Cupid, B. C., Zeng, Z., Singh, R., & Shuker, D. E. (2004). Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay. *Chemical research in toxicology*, 17(3), 294-300. doi: 10.1021/tx0340706
- de Kok, T. M., Engels, L. G., Moonen, E. J., & Kleinjans, J. C. (2005). Inflammatory bowel disease stimulates formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Gut*, 54(5), 731. doi: 10.1136/gut.2004.057471
- de Vogel, J., Jonker-Termont, D. S., van Lieshout, E. M., Katan, M. B., & van der Meer, R. (2005). Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis*, 26(2), 387-393. doi: 10.1093/carcin/bgh331
- de Vogel, J., van-Eck, W. B., Sesink, A. L., Jonker-Termont, D. S., Kleibeuker, J., & van der Meer, R. (2008). Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis*, 29(2), 398-403. doi: 10.1093/carcin/bgm278
- De Vos, M., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochemical pharmacology*, 84(2), 137-146. doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.018
- Dejea, C. M., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., White, J. R., Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., . . . Sears, C. L. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18321-18326. doi: 10.1073/pnas.1406199111
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research*, 45(W1), W180-W188. doi: 10.1093/nar/gkx295
- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research*, 46(4), 382-419. doi: 10.3109/10715762.2011.653969

- Dörsam, B. (2016). Role of PARP-1 in Colitis-associated Colorectal Cancer Induced by Alkylating N-nitroso compounds.
- Dörsam, B., Seiwert, N., Foersch, S., Stroh, S., Nagel, G., Begaliew, D., . . . Fahrer, J. (2018). PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), E4061-E4070. doi: 10.1073/pnas.1712345115
- DuBois, R. N., Tsujii, M., Bishop, P., Awad, J. A., Makita, K., & Lanahan, A. (1994). Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *The American journal of physiology*, 266(5 Pt 1), G822-827. doi: 10.1152/ajpgi.1994.266.5.G822
- Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M., & Modrich, P. (1996). Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6443-6447.
- Eckert, R., Apfelbach, R., Ganslosser, U., Harder, W., Koch, M., Randall, D., . . . French, K. (2002). *Tierphysiologie*: Thieme.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996-998. doi: 10.1038/nmeth.2604
- Elder, R. H., Jansen, J. G., Weeks, R. J., Willington, M. A., Deans, B., Watson, A. J., . . . Margison, G. P. (1998). Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate. *Molecular and cellular biology*, 18(10), 5828-5837.
- Ellermann, M., & Arthur, J. C. (2017). Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free radical biology & medicine*, 105, 68-78. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489
- Elphick, D. A., & Mahida, Y. R. (2005). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, 54(12), 1802-1809. doi: 10.1136/gut.2005.068601
- Engelward, B. P., Weeda, G., Wyatt, M. D., Broekhof, J. L., de Wit, J., Donker, I., . . . Samson, L. D. (1997). Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13087-13092. doi: 10.1073/pnas.94.24.13087
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M. M., . . . Kuhl, A. A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(8), 4557-4576.
- Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., . . . Herman, J. G. (2001a). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human molecular genetics*, 10(26), 3001-3007. doi: 10.1093/hmg/10.26.3001
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., . . . Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine*, 343(19), 1350-1354. doi: 10.1056/NEJM200011093431901
- Esteller, M., Risques, R. A., Toyota, M., Capella, G., Moreno, V., Peinado, M. A., . . . Herman, J. G. (2001b). Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer research*, 61(12), 4689-4692.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*, 11(1), 81-128.

- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2(1), 6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6
- Fagarasan, S., & Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature reviews. Immunology*, 3(1), 63-72. doi: 10.1038/nri982
- Fahrer, Huelsenbeck, J., Jaurich, H., Dorsam, B., Frisan, T., Eich, M., . . . Fritz, G. (2014). Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA repair*, 18, 31-43. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.002
- Fahrer, & Kaina, B. (2013). O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 34(11), 2435-2442. doi: 10.1093/carcin/bgt275
- Fahrer, J., Frisch, J., Nagel, G., Kraus, A., Dorsam, B., Thomas, A. D., . . . Kaina, B. (2015). DNA repair by MGMT, but not AAG, causes a threshold in alkylation-induced colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 36(10), 1235-1244. doi: 10.1093/carcin/bgv114
- Fahrer, J., & Kaina, B. (2017). Impact of DNA repair on the dose-response of colorectal cancer formation induced by dietary carcinogens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 106(Pt B), 583-594. doi: 10.1016/j.fct.2016.09.029
- Fais, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., & Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins*, 10(4). doi: 10.3390/toxins10040151
- Fearon, E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology*, 6, 479-507. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- Feng, Z., Hu, W., Amin, S., & Tang, M. S. (2003). Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*, 42(25), 7848-7854. doi: 10.1021/bi034431g
- Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., . . . Wang, J. (2015). Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nature communications*, 6, 6528. doi: 10.1038/ncomms7528
- Frisch, J. (2013). Untersuchung der Alkylantien-vermittelten DNASchadensantwort in DNA-Reparatur-defizienten Mäusen.
- Fu, D., Calvo, J. A., & Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature reviews. Cancer*, 12(2), 104-120. doi: 10.1038/nrc3185
- Gangadharan, D., & Cheroutre, H. (2004). The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. *Current opinion in immunology*, 16(3), 264-270. doi: 10.1016/j.coi.2004.03.015
- Geissler, C., & Singh, M. (2011). Iron, meat and health. *Nutrients*, 3(3), 283-316. doi: 10.3390/nu3030283
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vazquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., . . . Xavier, R. J. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, 15(3), 382-392. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.005
- Gilsing, A. M., Fransen, F., de Kok, T. M., Goldbohm, A. R., Schouten, L. J., de Bruine, A. P., . . . Weijenberg, M. P. (2013). Dietary heme iron and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. *Carcinogenesis*, 34(12), 2757-2766. doi: 10.1093/carcin/bgt290
- Glassner, B. J., Weeda, G., Allan, J. M., Broekhof, J. L., Carls, N. H., Donker, I., . . . Samson, L. D. (1999). DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are



- sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis*, 14(3), 339-347.
- Göder, A., Nagel, G., Kraus, A., Dorsam, B., Seiwert, N., Kaina, B., & Fahrner, J. (2015). Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction. *Carcinogenesis*, 36(8), 817-831. doi: 10.1093/carcin/bgv070
- Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., & Magness, S. T. (2013). Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PloS one*, 8(6), e66465. doi: 10.1371/journal.pone.0066465
- Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(9), 1967-1979. doi: 10.1200/JCO.2000.18.9.1967
- Gottlieb, Y., Truman, M., Cohen, L. A., Leichtmann-Bardoogo, Y., & Meyron-Holtz, E. G. (2012). Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*, 97(10), 1489-1493. doi: 10.3324/haematol.2012.063651
- Gottschalg, E., Scott, G. B., Burns, P. A., & Shuker, D. E. (2007). Potassium diazoacetate-induced p53 mutations in vitro in relation to formation of O<sup>6</sup>-carboxymethyl- and O<sup>6</sup>-methyl-2'-deoxyguanosine DNA adducts: relevance for gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, 28(2), 356-362. doi: 10.1093/carcin/bgl150
- Grabinger, T., Delgado, E., & Brunner, T. (2016). Analysis of Cell Death Induction in Intestinal Organoids In Vitro. *Methods in molecular biology*, 1419, 83-93. doi: 10.1007/978-1-4939-3581-9\_7
- Grasbeck, R., Kouvonen, I., Lundberg, M., & Tenhunen, R. (1979). An intestinal receptor for heme. *Scandinavian journal of haematology*, 23(1), 5-9. doi: 10.1111/j.1600-0609.1979.tb02845.x
- Gruenheid, S., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D. J., Grinstein, S., & Gros, P. (1999). The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *The Journal of experimental medicine*, 189(5), 831-841.
- Gueraud, F., Tache, S., Steghens, J. P., Milkovic, L., Borovic-Sunjic, S., Zarkovic, N., . . . Priymenko, N. (2015). Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free radical biology & medicine*, 83, 192-200. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.023
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., & Frisan, T. (2011). The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*, 3(3), 172-190. doi: 10.3390/toxins3030172
- Guidi, R., Guerra, L., Levi, L., Stenerlow, B., Fox, J. G., Josenhans, C., . . . Frisan, T. (2013). Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cellular microbiology*, 15(1), 98-113. doi: 10.1111/cmi.12034
- Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. (2014). Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 307(4), G397-409. doi: 10.1152/ajpgi.00348.2013
- Gupta, R., Sinha, S., & Paul, R. N. (2018). The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Current problems in cancer*, 42(6), 548-559. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010
- Gupte, R., Liu, Z., & Kraus, W. L. (2017). PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes & development*, 31(2), 101-126. doi: 10.1101/gad.291518.116
- Habermeyer, M., Roth, A., Guth, S., Diel, P., Engel, K. H., Epe, B., . . . Eisenbrand, G. (2015). Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human

- health. *Molecular nutrition & food research*, 59(1), 106-128. doi: 10.1002/mnfr.201400286
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(4), 199-210. doi: 10.1038/s41580-019-0110-x
- Haldar, M., Kohyama, M., So, A. Y., Kc, W., Wu, X., Briseno, C. G., . . . Murphy, K. M. (2014). Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell*, 156(6), 1223-1234. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.069
- Hallberg, L., Brune, M., & Rossander, L. (1989). The role of vitamin C in iron absorption. *International journal for vitamin and nutrition research. Supplement = Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Supplement*, 30, 103-108.
- Han, O. (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics : integrated biometal science*, 3(2), 103-109. doi: 10.1039/c0mt00043d
- Harrison, Fairhurst, N., Challis, B. C., & Shuker, D. E. (1997). Synthesis, characterization, and immunochemical detection of O6-(carboxymethyl)-2'-deoxyguanosine: a DNA adduct formed by nitrosated glycine derivatives. *Chemical research in toxicology*, 10(6), 652-659. doi: 10.1021/tx960203u
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1275(3), 161-203.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., . . . Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382), 1509-1512.
- Hebels, D. G., Sveje, K. M., de Kok, M. C., van Herwijnen, M. H., Kuhnle, G. G., Engels, L. G., . . . de Kok, T. M. (2012). Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(2), 95-103. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.038
- Herfarth, K. K., Brent, T. P., Danam, R. P., Remack, J. S., Kodner, I. J., Wells, S. A., Jr., & Goodfellow, P. J. (1999). A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Molecular carcinogenesis*, 24(2), 90-98.
- Heylmann, D., & Kaina, B. (2016). The gammaH2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Scientific reports*, 6, 22682. doi: 10.1038/srep22682
- Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., . . . Takeda, K. (2005). The nuclear I kappa B protein I kappa BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *Journal of immunology*, 174(6), 3650-3657. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3650
- Hoffmann, J. C., Peters, K., Henschke, S., Herrmann, B., Pfister, K., Westermann, J., & Zeitz, M. (2001). Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut*, 48(4), 489-495. doi: 10.1136/gut.48.4.489
- Hold, G. L., & Garrett, W. S. (2015). Gut microbiota. Microbiota organization--a key to understanding CRC development. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(3), 128-129. doi: 10.1038/nrgastro.2015.25
- Holtrop, G., Johnstone, A. M., Fyfe, C., & Gratz, S. W. (2012). Diet composition is associated with endogenous formation of N-nitroso compounds in obese men. *The Journal of nutrition*, 142(9), 1652-1658. doi: 10.3945/jn.112.158824
- Hooda, J., Shah, A., & Zhang, L. (2014). Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients*, 6(3), 1080-1102. doi: 10.3390/nu6031080

- Housseau, F., & Sears, C. L. (2010). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (Apc<sup>+/-</sup>) mice: a human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell cycle*, 9(1), 3-5. doi: 10.4161/cc.9.1.10352
- Hu, M. D., & Edelblum, K. L. (2017). Sentinels at the frontline: the role of intraepithelial lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Current pharmacology reports*, 3(6), 321-334. doi: 10.1007/s40495-017-0105-2
- Hughes, R., Cross, A. J., Pollock, J. R., & Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 22(1), 199-202.
- Ichikawa, D., Asano, M., Shinton, S. A., Brill-Dashoff, J., Formica, A. M., Velcich, A., . . . Hayakawa, K. (2015). Natural anti-intestinal goblet cell autoantibody production from marginal zone B cells. *Journal of immunology*, 194(2), 606-614. doi: 10.4049/jimmunol.1402383
- Ijssennagger, Belzer, C., Hooiveld, G. J., Dekker, J., van Mil, S. W., Muller, M., . . . van der Meer, R. (2015). Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(32), 10038-10043. doi: 10.1073/pnas.1507645112
- Ijssennagger, Derrien, M., van Doorn, G. M., Rijnierse, A., van den Bogert, B., Muller, M., . . . van der Meer, R. (2012a). Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. *PloS one*, 7(12), e49868. doi: 10.1371/journal.pone.0049868
- Ijssennagger, Rijnierse, A., de Wit, N., Jonker-Termont, D., Dekker, J., Muller, M., & van der Meer, R. (2012b). Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon. *Gut*, 61(7), 1041-1049. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300239
- Ijssennagger, Rijnierse, A., de Wit, N. J., Boekschoten, M. V., Dekker, J., Schonewille, A., . . . van der Meer, R. (2013). Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis*, 34(7), 1628-1635. doi: 10.1093/carcin/bgt084
- Iniguez, M. A., Punzon, C., & Fresno, M. (1999). Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *Journal of immunology*, 163(1), 111-119.
- Isaksson-Mettavainio, M., Palmqvist, R., Forssell, J., Stenling, R., & Oberg, A. (2006). SMAD4/DPC4 expression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer research*, 26(1B), 507-510.
- Ismail, A. S., Severson, K. M., Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Yu, X., Benjamin, J. L., . . . Hooper, L. V. (2011). Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8743-8748. doi: 10.1073/pnas.1019574108
- Iyama, T., & Wilson, D. M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Jägerstad, M., Skog, K., Grivas, S., & Olsson, K. (1991). Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation research*, 259(3-4), 219-233. doi: 10.1016/0165-1218(91)90119-7
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787-8803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787
- Janssen, K., Eichhorn-Grombacher, U., Schlink, K., Nitzsche, S., Oesch, F., & Kaina, B. (2001). Long-time expression of DNA repair enzymes MGMT and APE in human peripheral blood mononuclear cells. *Archives of toxicology*, 75(5), 306-312. doi: 10.1007/s002040100226
- Jiang, W., Wang, X., Zeng, B., Liu, L., Tardivel, A., Wei, H., . . . Zhou, R. (2013). Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal

- intraepithelial lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 210(11), 2465-2476. doi: 10.1084/jem.20122490
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control* : CCC, 24(6), 1207-1222. doi: 10.1007/s10552-013-0201-5
- Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *The Journal of biological chemistry*, 268(12), 9049-9054.
- Jones, R. P., Sutton, P. A., Evans, J. P., Clifford, R., McAvoy, A., Lewis, J., . . . Malik, H. Z. (2017). Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *British journal of cancer*, 116(7), 923-929. doi: 10.1038/bjc.2017.37
- Joosen, A. M., Kuhnle, G. G., Aspinall, S. M., Barrow, T. M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., . . . Bingham, S. A. (2009). Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30(8), 1402-1407. doi: 10.1093/carcin/bgp130
- Kadivar, M., Petersson, J., Svensson, L., & Marsal, J. (2016). CD8alphabeta+ gammadelta T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of immunology*, 197(12), 4584-4592. doi: 10.4049/jimmunol.1601146
- Kaim, W., & Schwederski, B. (2005). *Bioanorganische Chemie* (Vol. 4., durchgesehene Auflage ed.): Vieweg+Teubner.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*, 6(8), 1079-1099. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.03.008
- Kaiser, W. J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J. W., Gough, P. J., . . . Mocarski, E. S. (2013). Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of biological chemistry*, 288(43), 31268-31279. doi: 10.1074/jbc.M113.462341
- Kaler, P., Augenlicht, L., & Klampfer, L. (2012). Activating mutations in beta-catenin in colon cancer cells alter their interaction with macrophages; the role of snail. *PloS one*, 7(9), e45462. doi: 10.1371/journal.pone.0045462
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Nunez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology*, 13(5), 321-335. doi: 10.1038/nri3430
- Kim, Y. J., & Wilson, D. M., 3rd. (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 3-13.
- Knutson, M. D. (2010). Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annual review of nutrition*, 30, 149-171. doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104801
- Kober, O. I., Ahl, D., Pin, C., Holm, L., Carding, S. R., & Juge, N. (2014). gammadelta T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(7), G582-593. doi: 10.1152/ajpgi.00218.2013
- Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., Matsumoto, S., Hashimoto, Y., Obana, S., . . . et al. (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), 6147-6151.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., . . . Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784-1787.
- Kraus, A., McKeague, M., Seiwert, N., Nagel, G., Geisen, S. M., Ziegler, N., . . . Fahrner, J. (2019). Immunological and mass spectrometry-based approaches to determine

- thresholds of the mutagenic DNA adduct O(6)-methylguanine in vivo. *Archives of toxicology*, 93(2), 559-572. doi: 10.1007/s00204-018-2355-0
- Kubben, F. J., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L. G., Baeten, C. G., Schutte, B., Arends, J. W., . . . Blijham, G. H. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut*, 35(4), 530-535. doi: 10.1136/gut.35.4.530
- Kuhnle, G. G., Story, G. W., Reda, T., Mani, A. R., Moore, K. P., Lunn, J. C., & Bingham, S. A. (2007). Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free radical biology & medicine*, 43(7), 1040-1047. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.011
- Kuo, L. J., & Yang, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 22(3), 305-309.
- Lara-Tejero, M. (2001). A bacterial toxin that causes DNA damage to modulate cellular responses. *TheScientificWorldJournal*, 1, 190-191. doi: 10.1100/tsw.2001.27
- Larsen, P. E., & Dai, Y. (2015). Metabolome of human gut microbiome is predictive of host dysbiosis. *GigaScience*, 4, 42. doi: 10.1186/s13742-015-0084-3
- Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., & Gozzelino, R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in pharmacology*, 3, 77. doi: 10.3389/fphar.2012.00077
- Latunde-Dada, G. O., Takeuchi, K., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2006). Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS letters*, 580(30), 6865-6870. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.048
- Le Leu, R. K., Winter, J. M., Christophersen, C. T., Young, G. P., Humphreys, K. J., Hu, Y., . . . Conlon, M. A. (2015). Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: a randomised clinical trial. *The British journal of nutrition*, 114(2), 220-230. doi: 10.1017/S0007114515001750
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649. doi: 10.1038/25292
- Leuratti, C., Watson, M. A., Deag, E. J., Welch, A., Singh, R., Gottschalg, E., . . . Bingham, S. A. (2002). Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(3), 267-273.
- Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., & Andrews, N. C. (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature genetics*, 21(4), 396-399. doi: 10.1038/7727
- Lewin, M. H., Bailey, N., Bandaletova, T., Bowman, R., Cross, A. J., Pollock, J., . . . Bingham, S. A. (2006). Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer research*, 66(3), 1859-1865. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2237
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation research*, 443(1-2), 129-138. doi: 10.1016/s1383-5742(99)00015-0
- Lind, G. E., Thorstensen, L., Lovig, T., Meling, G. I., Hamelin, R., Rognum, T. O., . . . Lothe, R. A. (2004). A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Molecular cancer*, 3, 28. doi: 10.1186/1476-4598-3-28
- Lombardi-Boccia, G., Martinez-Dominguez, B., & Aguzzi, A. (2002). Total Heme and Non-heme Iron in Raw and Cooked Meats. *Food and chemical toxicology : an*

- international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 67(5).
- Loo, D. T., & Rillema, J. R. (1998). Measurement of cell death. *Methods in cell biology*, 57, 251-264. doi: 10.1016/s0091-679x(08)61583-6
- Lucke, K., Miehlke, S., Jacobs, E., & Schuppler, M. (2006). Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. in ulcerative colitis. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 5), 617-624. doi: 10.1099/jmm.0.46198-0
- Lüllmann-Rauch, R., & Esther, A. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme.
- Luongo, D., D'Arienzo, R., Bergamo, P., Maurano, F., & Rossi, M. (2009). Immunomodulation of gut-associated lymphoid tissue: current perspectives. *International reviews of immunology*, 28(6), 446-464. doi: 10.3109/08830180903236486
- Ma, X. T., Wang, S., Ye, Y. J., Du, R. Y., Cui, Z. R., & Somsouk, M. (2004). Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 10(11), 1569-1573. doi: 10.3748/wjg.v10.i11.1569
- Macdonald, T. T., & Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307(5717), 1920-1925. doi: 10.1126/science.1106442
- Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G. A., Turrone, F., Cocconi, D., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS microbiology ecology*, 93(12). doi: 10.1093/femsec/fix153
- Mangerich, A., & Burkle, A. (2012). Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and aging: genome maintenance meets inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 321653. doi: 10.1155/2012/321653
- Marengo-Rowe, A. J. (2006). Structure-function relations of human hemoglobins. *Proceedings*, 19(3), 239-245. doi: 10.1080/08998280.2006.11928171
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 361(25), 2449-2460. doi: 10.1056/NEJMra0804588
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research*, 424(1-2), 83-95.
- Martin, Lin, C., Naud, N., Tache, S., Raymond-Letron, I., Corpet, D. E., & Pierre, F. H. (2015). Antibiotic suppression of intestinal microbiota reduces heme-induced lipoperoxidation associated with colon carcinogenesis in rats. *Nutrition and cancer*, 67(1), 119-125. doi: 10.1080/01635581.2015.976317
- Martin, Naud, N., Tache, S., Debrauwer, L., Chevolleau, S., Dupuy, J., . . . Pierre, F. H. F. (2018). Targeting Colon Luminal Lipid Peroxidation Limits Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Consumption. *Cancer prevention research*, 11(9), 569-580. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0361
- Martin, O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., & Green, D. R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 270(12), 6425-6428. doi: 10.1074/jbc.270.12.6425
- Martinez-Torres, C., & Layrisse, M. (1971). Iron absorption from veal muscle. *The American journal of clinical nutrition*, 24(5), 531-540. doi: 10.1093/ajcn/24.5.531
- Matsuoka, K., & Kanai, T. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in immunopathology*, 37(1), 47-55. doi: 10.1007/s00281-014-0454-4
- Meek, D. W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews. Cancer*, 9(10), 714-723. doi: 10.1038/nrc2716
- Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C. W., Pang, B., Borenshtein, D., . . . Samson, L. D. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(7), 2516-2525. doi: 10.1172/JCI35073

- Mimmeler, M., Peter, S., Kraus, A., Stroh, S., Nikolova, T., Seiwert, N., . . . Fahrer, J. (2016). DNA damage response curtails detrimental replication stress and chromosomal instability induced by the dietary carcinogen PhIP. *Nucleic acids research*, 44(21), 10259-10276. doi: 10.1093/nar/gkw791
- Mojas, N., Lopes, M., & Jiricny, J. (2007). Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes & development*, 21(24), 3342-3355. doi: 10.1101/gad.455407
- Monsen, E. R., Hallberg, L., Layrisse, M., Hegsted, D. M., Cook, J. D., Mertz, W., & Finch, C. A. (1978). Estimation of available dietary iron. *The American journal of clinical nutrition*, 31(1), 134-141. doi: 10.1093/ajcn/31.1.134
- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*, 8(12), e1002808. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002808
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 275(5307), 1787-1790.
- Mudter, J., Weigmann, B., Bartsch, B., Kiesslich, R., Strand, D., Galle, P. R., . . . Neurath, M. F. (2005). Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology*, 100(1), 64-72. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40615.x
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* doi:https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4
- Musso, A., Dentelli, P., Carlino, A., Chiusa, L., Repici, A., Sturm, A., . . . Brizzi, M. F. (2005). Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*, 11(2), 91-98.
- Nanno, M., Kanari, Y., Naito, T., Inoue, N., Hisamatsu, T., Chinen, H., . . . Ishikawa, H. (2008). Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology*, 134(2), 481-490. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.056
- Narayan, S., & Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular cancer*, 2, 41. doi: 10.1186/1476-4598-2-41
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., . . . Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704), 2090-2093. doi: 10.1126/science.1104742
- Noffsinger, A. E. (2009). Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual review of pathology*, 4, 343-364. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092317
- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., . . . Riboli, E. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906-916. doi: 10.1093/jnci/dji164
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., & Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: an estimate of attributable and preventable fractions. *IARC scientific publications*, 156, 223-225.
- Nougayrede, J. P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., . . . Oswald, E. (2006). Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313(5788), 848-851. doi: 10.1126/science.1127059
- Nucci, M. R., Robinson, C. R., Longo, P., Campbell, P., & Hamilton, S. R. (1997). Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Human pathology*, 28(12), 1396-1407.



- Ochiai, M., Ushigome, M., Fujiwara, K., Ubagai, T., Kawamori, T., Sugimura, T., . . . Nakagama, H. (2003). Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *The American journal of pathology*, 163(4), 1607-1614. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63517-1
- Olivares-Villagomez, D., Mendez-Fernandez, Y. V., Parekh, V. V., Lalani, S., Vincent, T. L., Cheroutre, H., & Van Kaer, L. (2008). Thymus leukemia antigen controls intraepithelial lymphocyte function and inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17931-17936. doi: 10.1073/pnas.0808242105
- Osaka, T., Moriyama, E., Arai, S., Date, Y., Yagi, J., Kikuchi, J., & Tsuneda, S. (2017). Meta-Analysis of Fecal Microbiota and Metabolites in Experimental Colitic Mice during the Inflammatory and Healing Phases. *Nutrients*, 9(12). doi: 10.3390/nu9121329
- Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., . . . Taketo, M. M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, 87(5), 803-809.
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., . . . et al. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263(5153), 1625-1629.
- Parham, N. J., & Gibson, G. R. (2000). Microbes involved in dissimilatory nitrate reduction in the human large intestine. *FEMS microbiology ecology*, 31(1), 21-28. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00667.x
- Parkin, D. M., Boyd, L., & Walker, L. C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British journal of cancer*, 105 Suppl 2, S77-81. doi: 10.1038/bjc.2011.489
- Parsons, D. W., Wang, T. L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J. M., DeLong, L., . . . Velculescu, V. E. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*, 436(7052), 792. doi: 10.1038/436792a
- Peltomaki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179. doi: 10.1200/JCO.2003.04.060
- Peters, B. A., Dominianni, C., Shapiro, J. A., Church, T. R., Wu, J., Miller, G., . . . Ahn, J. (2016). The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer. *Microbiome*, 4(1), 69. doi: 10.1186/s40168-016-0218-6
- Pierre, Freeman, A., Tache, S., Van der Meer, R., & Corpet, D. E. (2004). Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *The Journal of nutrition*, 134(10), 2711-2716. doi: 10.1093/jn/134.10.2711
- Pierre, Peiro, G., Tache, S., Cross, A. J., Bingham, S. A., Gasc, N., . . . Gueraud, F. (2006). New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(11), 2274-2279. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0085
- Pierre, Santarelli, R., Tache, S., Gueraud, F., & Corpet, D. E. (2008). Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *The British journal of nutrition*, 99(5), 1000-1006. doi: 10.1017/S0007114507843558
- Pierre, Santarelli, R. L., Allam, O., Tache, S., Naud, N., Gueraud, F., & Corpet, D. E. (2010). Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutrition and cancer*, 62(5), 567-573. doi: 10.1080/01635580903532408
- Pierre, Tache, S., Petit, C. R., Van der Meer, R., & Corpet, D. E. (2003). Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis

- at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis*, 24(10), 1683-1690. doi: 10.1093/carcin/bgg130
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065
- Porter, A. G., & Janicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99-104. doi: 10.1038/sj.cdd.4400476
- Purchas, R. W., Simcock, D. C., Knight, T. W., & Wilkinson, B. H. P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 827-837.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. doi: 10.1038/nature08821
- Qing, Y., Xie, H., Su, C., Wang, Y., Yu, Q., Pang, Q., & Cui, F. (2018). Gut Microbiome, Short-Chain Fatty Acids, and Mucosa Injury in Young Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Digestive diseases and sciences*. doi: 10.1007/s10620-018-5428-2
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S. H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., . . . Goldman, I. D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, 127(5), 917-928. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041
- Qiu, Z., & Sheridan, B. S. (2018). Isolating Lymphocytes from the Mouse Small Intestinal Immune System. *Journal of visualized experiments : JoVE*(132). doi: 10.3791/57281
- Quiros, S., Roos, W. P., & Kaina, B. (2010). Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell cycle*, 9(1), 168-178. doi: 10.4161/cc.9.1.10363
- Raffin, S. B., Woo, C. H., Roost, K. T., Price, D. C., & Schmid, R. (1974). Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *The Journal of clinical investigation*, 54(6), 1344-1352. doi: 10.1172/JCI107881
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418(6901), 934. doi: 10.1038/418934a
- Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(9), 695-701. doi: 10.1038/nrc1165
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., & Kim, S. S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3584-3588. doi: 10.1073/pnas.0630018100
- Reedy, C. J., & Gibney, B. R. (2004). Heme protein assemblies. *Chemical reviews*, 104(2), 617-649. doi: 10.1021/cr0206115
- Reissig, S., Hackenbruch, C., & Hovelmeyer, N. (2014). Isolation of T cells from the gut. *Methods in molecular biology*, 1193, 21-25. doi: 10.1007/978-1-4939-1212-4\_3
- Rhee, K. J., Wu, S., Wu, X., Huso, D. L., Karim, B., Franco, A. A., . . . Sears, C. L. (2009). Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infection and immunity*, 77(4), 1708-1718. doi: 10.1128/IAI.00814-08
- Richards, M. P. (2013). Redox reactions of myoglobin. *Antioxidants & redox signaling*, 18(17), 2342-2351. doi: 10.1089/ars.2012.4887
- Rink, L., Kruse, A., & Haase, H. (2012). *Immunologie für Einsteiger*
- Roig, A. I., Eskicak, U., Hight, S. K., Kim, S. B., Delgado, O., Souza, R. F., . . . Shay, J. W. (2010). Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate in vitro. *Gastroenterology*, 138(3), 1012-1021 e1011-1015. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.052

- Rouault, T. A. (2005). The intestinal heme transporter revealed. *Cell*, 122(5), 649-651. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.027
- Sadrzadeh, S. M., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P. E., & Eaton, J. W. (1984). Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *The Journal of biological chemistry*, 259(23), 14354-14356.
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96-99. doi: 10.1038/34214
- Sakumi, K., Shiraishi, A., Shimizu, S., Tsuzuki, T., Ishikawa, T., & Sekiguchi, M. (1997). Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer research*, 57(12), 2415-2418.
- Samuels, Y., & Velculescu, V. E. (2004). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell cycle*, 3(10), 1221-1224. doi: 10.4161/cc.3.10.1164
- Sang, L. X., Chang, B., Zhu, J. F., Yang, F. L., Li, Y., Jiang, X. F., . . . Sun, X. (2017). Sodium selenite ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by decreasing Th1, Th17, and gammadeltaT and increasing CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell responses. *World journal of gastroenterology*, 23(21), 3850-3863. doi: 10.3748/wjg.v23.i21.3850
- Sansone, P., & Bromberg, J. (2012). Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(9), 1005-1014. doi: 10.1200/JCO.2010.31.8907
- Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and cancer*, 60(2), 131-144. doi: 10.1080/01635580701684872
- Sanz, Y., & De Palma, G. (2009). Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International reviews of immunology*, 28(6), 397-413. doi: 10.3109/08830180903215613
- Sawa, T., Akaike, T., Kida, K., Fukushima, Y., Takagi, K., & Maeda, H. (1998). Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7(11), 1007-1012.
- Schaeferhenrich, A., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Kuechler, A., Haag, N., Weise, A., . . . Pool-Zobel, B. L. (2003). Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutation research*, 526(1-2), 19-32.
- Schepens, M. A., Vink, C., Schonewille, A. J., Dijkstra, G., van der Meer, R., & Bovee-Oudenhoven, I. M. (2011). Dietary heme adversely affects experimental colitis in rats, despite heat-shock protein induction. *Nutrition*, 27(5), 590-597. doi: 10.1016/j.nut.2010.05.002
- Schmid, A. (2006). Einfluss von Nitrat und Nitrit aus Fleischerzeugnissen auf die Gesundheit des Menschen *Ernährungs-Umschau*, 53, Heft 12.
- Schulte, M., Erik, S., & Udo, S. (2005). *Prometheus - Lernatlas der Anatomie.*: Thieme.
- Schünke, Schulte E, & U, S. (2009). *Innere Organe* (2 ed.): Prometheus LernAtlas.
- Schwabe, R. F., & Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(11), 800-812. doi: 10.1038/nrc3610
- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S. I., Ziegler, P. K., . . . Greten, F. R. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, 152(1-2), 25-38. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012
- Segain, J. P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., . . . Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3), 397-403.
- Seiwert, N., Neitzel, C., Stroh, S., Frisan, T., Audebert, M., Toulany, M., . . . Fahrner, J. (2017). AKT2 suppresses pro-survival autophagy triggered by DNA double-strand

- breaks in colorectal cancer cells. *Cell death & disease*, 8(8), e3019. doi: 10.1038/cddis.2017.418
- Senthong, P., Millington, C. L., Wilkinson, O. J., Marriott, A. S., Watson, A. J., Reamtong, O., . . . Povey, A. C. (2013). The nitrosated bile acid DNA lesion O6-carboxymethylguanine is a substrate for the human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Nucleic acids research*, 41(5), 3047-3055. doi: 10.1093/nar/gks1476
- Sesink, Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., & Van der Meer, R. (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer research*, 59(22), 5704-5709.
- Sesink, Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., & Van Der Meer, R. (2000). Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis*, 21(10), 1909-1915.
- Sesink, Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., & Van der Meer, R. (2001). Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis*, 22(10), 1653-1659.
- Shattuck-Brandt, R. L., Varilek, G. W., Radhika, A., Yang, F., Washington, M. K., & DuBois, R. N. (2000). Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology*, 118(2), 337-345.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., . . . McKie, A. T. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 122(5), 789-801. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.025
- Sheehan, K. M., Sheahan, K., O'Donoghue, D. P., MacSweeney, F., Conroy, R. M., Fitzgerald, D. J., & Murray, F. E. (1999). The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *Jama*, 282(13), 1254-1257.
- Shiao, S. L., Ganesan, A. P., Rugo, H. S., & Coussens, L. M. (2011). Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes & development*, 25(24), 2559-2572. doi: 10.1101/gad.169029.111
- Shivapurkar, N., Huang, L., Ruggeri, B., Swalsky, P. A., Bakker, A., Finkelstein, S., . . . Silverberg, S. (1997). K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer letters*, 115(1), 39-46.
- Shuker, D. E., & Margison, G. P. (1997). Nitrosated glycine derivatives as a potential source of O6-methylguanine in DNA. *Cancer research*, 57(3), 366-369.
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20-31. doi: 10.1111/nyas.12811
- Singer, II, Kawka, D. W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T., & Stenson, W. F. (1998). Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 115(2), 297-306.
- Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287(5457), 1431-1433. doi: 10.1126/science.287.5457.1431
- Smith, A. J., Stern, H. S., Penner, M., Hay, K., Mitri, A., Bapat, B. V., & Gallinger, S. (1994). Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer research*, 54(21), 5527-5530.
- Sodring, M., Gunnes, G., & Paulsen, J. E. (2016). Spontaneous initiation, promotion and progression of colorectal cancer in the novel A/J Min/+ mouse. *International journal of cancer*, 138(8), 1936-1946. doi: 10.1002/ijc.29928
- Sodring, M., Oostindjer, M., Egelanddal, B., & Paulsen, J. E. (2015). Effects of hemin and nitrite on intestinal tumorigenesis in the A/J Min/+ mouse model. *PloS one*, 10(4), e0122880. doi: 10.1371/journal.pone.0122880
- Spano, J. P., Lagorce, C., Atlan, D., Milano, G., Domont, J., Benamouzig, R., . . . Wind, P. (2005). Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(1), 102-108. doi: 10.1093/annonc/mdi006

- Steinberg, P. (2019). Red Meat-Derived Nitroso Compounds, Lipid Peroxidation Products and Colorectal Cancer. *Foods*, 8(7). doi: 10.3390/foods8070252
- Stewart, B., & Wild, C. (2014). *World Cancer report. WHO.*
- Sugimoto, K. (2008). Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 14(33), 5110-5114.
- Sugimura, T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, 21(3), 387-395. doi: 10.1093/carcin/21.3.387
- Surya, R., Helies-Toussaint, C., Martin, O. C., Gauthier, T., Gueraud, F., Tache, S., . . . Huc, L. (2016). Red meat and colorectal cancer: Nrf2-dependent antioxidant response contributes to the resistance of preneoplastic colon cells to fecal water of hemoglobin- and beef-fed rats. *Carcinogenesis*, 37(6), 635-645. doi: 10.1093/carcin/bgw035
- Tahara, T., Yamamoto, E., Suzuki, H., Maruyama, R., Chung, W., Garriga, J., . . . Issa, J.-P. J. (2014). Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer research*, 74(5), 1311-1318. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1865
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of carcinogenesis*, 8, 5.
- Termini, J. (2000). Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutation research*, 450(1-2), 107-124.
- Terrell, J. R., Gumpfer, R. H., & Luo, M. (2018). Hemoglobin crystals immersed in liquid oxygen reveal diffusion channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(2), 1858-1863. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.038
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114 e2105. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058
- Tiso, M., & Schechter, A. N. (2015). Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PloS one*, 10(3), e0119712. doi: 10.1371/journal.pone.0119712
- Traskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., . . . Kokesova, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters*, 93(2-3), 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2007). High red meat diets induce greater numbers of colonic DNA double-strand breaks than white meat in rats: attenuation by high-amylose maize starch. *Carcinogenesis*, 28(11), 2355-2362. doi: 10.1093/carcin/bgm216
- Toprak, N. U., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T., & Soyletir, G. (2006). A possible role of Bacteroides fragilis enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(8), 782-786. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01494.x
- Torti, S. V., & Torti, F. M. (2013). Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature reviews. Cancer*, 13(5), 342-355. doi: 10.1038/nrc3495
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8681-8686.
- Tsai, H. H., Dwarakanath, A. D., Hart, C. A., Milton, J. D., & Rhodes, J. M. (1995). Increased faecal mucin sulphatase activity in ulcerative colitis: a potential target for treatment. *Gut*, 36(4), 570-576.
- Tsuji, M., & DuBois, R. N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3), 493-501.
- UICC. (2018). from <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>

- Valenzuela, C., de Romana, D. L., Olivares, M., Morales, M. S., & Pizarro, F. (2009). Total iron and heme iron content and their distribution in beef meat and viscera. *Biological trace element research*, 132(1-3), 103-111. doi: 10.1007/s12011-009-8400-3
- van Klinken, B. J., Einerhand, A. W., Duits, L. A., Makkink, M. K., Tytgat, K. M., Renes, I. B., . . . Dekker, J. (1999). Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. *The American journal of physiology*, 276(1), G115-124. doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.1.G115
- Vanden Bussche, J., Hemeryck, L. Y., Van Hecke, T., Kuhnle, G. G., Pasmans, F., Moore, S. A., . . . Vanhaecke, L. (2014). O(6)-carboxymethylguanine DNA adduct formation and lipid peroxidation upon in vitro gastrointestinal digestion of haem-rich meat. *Molecular nutrition & food research*, 58(9), 1883-1896. doi: 10.1002/mnfr.201400078
- Villalba, M., Evans, S. R., Vidal-Vanaclocha, F., & Calvo, A. (2017). Role of TGF-beta in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell and tissue research*, 370(1), 29-39. doi: 10.1007/s00441-017-2633-9
- Vital, M., Karch, A., & Pieper, D. H. (2017). Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems*, 2(6). doi: 10.1128/mSystems.00130-17
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., . . . Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*, 319(9), 525-532. doi: 10.1056/NEJM198809013190901
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* : TIG, 9(4), 138-141. doi: 10.1016/0168-9525(93)90209-z
- Wagener, F. A., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Verhofstad, A., Abraham, N. G., . . . Figdor, C. G. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 98(6), 1802-1811.
- Wali, R. K., Skarosi, S., Hart, J., Zhang, Y., Dolan, M. E., Moschel, R. C., . . . Bissonnette, M. (1999). Inhibition of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase increases azoxymethane-induced colonic tumors in rats. *Carcinogenesis*, 20(12), 2355-2360. doi: 10.1093/carcin/20.12.2355
- Wanders, L. K., Cordes, M., Voorham, Q., Sie, D., de Vries, S. D., d'haens, G., . . . Carvalho, B. (2019). IBD-Associated Dysplastic Lesions Show More Chromosomal Instability Than Sporadic Adenomas. *Inflammatory bowel diseases*. doi: 10.1093/ibd/izz171
- Wang, & Dubois, R. N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*, 29(6), 781-788. doi: 10.1038/onc.2009.421
- Wang, Ray, A., Jiang, X., Wang, J. Y., Basu, S., Liu, X., . . . Chu, Y. (2015). T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. *Mucosal immunology*, 8(6), 1297-1312. doi: 10.1038/mi.2015.20
- Wecklein, S. (2016). Einfluss der Hämoxygenase-1 auf DNA-Schädigung und Zelltodinduktion durch Hämin in humanen Kolonepithelzellen.
- Weinberg, E. D. (2009). Iron availability and infection. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(7), 600-605. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.07.002
- West, A. R., & Oates, P. S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World journal of gastroenterology*, 14(26), 4101-4110.
- Westbrook, A. M., & Schiestl, R. H. (2010). Atm-deficient mice exhibit increased sensitivity to dextran sulfate sodium-induced colitis characterized by elevated DNA damage and persistent immune activation. *Cancer research*, 70(5), 1875-1884. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2584
- Whitehall, V. L., Walsh, M. D., Young, J., Leggett, B. A., & Jass, J. R. (2001). Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal

- cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer research*, 61(3), 827-830.
- Winter, & Baumler, A. J. (2014a). Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut microbes*, 5(1), 71-73. doi: 10.4161/gmic.27129
- Winter, Nyskohus, L., Young, G. P., Hu, Y., Conlon, M. A., Bird, A. R., . . . Le Leu, R. K. (2011). Inhibition by resistant starch of red meat-induced promutagenic adducts in mouse colon. *Cancer prevention research*, 4(11), 1920-1928. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0176
- Winter, Young, G. P., Hu, Y., Gratz, S. W., Conlon, M. A., & Le Leu, R. K. (2014b). Accumulation of promutagenic DNA adducts in the mouse distal colon after consumption of heme does not induce colonic neoplasms in the western diet model of spontaneous colorectal cancer. *Molecular nutrition & food research*, 58(3), 550-558. doi: 10.1002/mnfr.201300430
- Wirtz, S., Nagel, G., Eshkind, L., Neurath, M. F., Samson, L. D., & Kaina, B. (2010). Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 31(12), 2111-2117. doi: 10.1093/carcin/bgq174
- Wright, D. P., Rosendale, D. I., & Robertson, A. M. (2000). Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS microbiology letters*, 190(1), 73-79. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09265.x
- Wu, S., Morin, P. J., Maouyo, D., & Sears, C. L. (2003). Bacteroides fragilis enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology*, 124(2), 392-400. doi: 10.1053/gast.2003.50047
- Xu-Welliver, M., & Pegg, A. E. (2002). Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 23(5), 823-830. doi: 10.1093/carcin/23.5.823
- Xue, X., & Shah, Y. M. (2013). Intestinal iron homeostasis and colon tumorigenesis. *Nutrients*, 5(7), 2333-2351. doi: 10.3390/nu5072333
- Yan, M., Rerko, R. M., Platzer, P., Dawson, D., Willis, J., Tong, M., . . . Markowitz, S. D. (2004). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17468-17473. doi: 10.1073/pnas.0406142101
- Yang, Xi, Z., Xue, Y., Ren, J., Sun, Y., Wang, B., . . . Bian, L. (2017). Hemoglobin pretreatment endows rat cortical astrocytes resistance to hemin-induced toxicity via Nrf2/HO-1 pathway. *Experimental cell research*, 361(2), 217-224. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.020
- Yang, Yoo, J. S., Ishizaki, H., & Hong, J. Y. (1990). Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug metabolism reviews*, 22(2-3), 147-159. doi: 10.3109/03602539009041082
- Yang, Zhang, W., Evans, P. M., Chen, X., He, X., & Liu, C. (2006). Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(26), 17751-17757. doi: 10.1074/jbc.M600831200
- Yeh, C. H., Bellon, M., & Nicot, C. (2018). FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Molecular cancer*, 17(1), 115. doi: 10.1186/s12943-018-0857-2
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111(10), 5944-5972. doi: 10.1021/cr200084z
- Young, G. P., Rose, I. S., & St John, D. J. (1989). Haem in the gut. I. Fate of haemoproteins and the absorption of haem. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 4(6), 537-545. doi: 10.1111/j.1440-1746.1989.tb00858.x
- Zaidi, N. H., Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Dumenco, L. L., Allay, E., & Gerson, S. L. (1995). Transgenic expression of human MGMT protects against azoxymethane-



- induced aberrant crypt foci and G to A mutations in the K-ras oncogene of mouse colon. *Carcinogenesis*, 16(3), 451-456. doi: 10.1093/carcin/16.3.451
- Zhang, J., Stevens, M. F., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 102-114.
- Zhang, F., Tsunoda, M., Suzuki, K., Kikuchi, Y., Wilkinson, O., Millington, C. L., . . . Takenaka, A. (2013). Structures of DNA duplexes containing O6-carboxymethylguanine, a lesion associated with gastrointestinal cancer, reveal a mechanism for inducing pyrimidine transition mutations. *Nucleic acids research*, 41(10), 5524-5532. doi: 10.1093/nar/gkt198
- Zhang, M., Zhou, Q., Dorfman, R. G., Huang, X., Fan, T., Zhang, H., . . . Yu, C. (2016). Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats. *BMC gastroenterology*, 16(1), 84. doi: 10.1186/s12876-016-0500-x
- Zhang, X., Gaspard, J. P., & Chung, D. C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research*, 61(16), 6050-6054.
- Zillmer, H. (2017). Effekte einer Häm-Eisen-haltigen Diät auf die Inflammation und DNA-Schädigung in DNA-Reparatur-defizienten Mäusen.
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., . . . Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European journal of clinical nutrition*, 66(1), 53-60. doi: 10.1038/ejcn.2011.141